

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA AZEVEDO DE ABREU

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora* sp. e *Toxoplasma gondii* E
SUA INVESTIGAÇÃO NO SÊMEN DE GARANHÕES EM PROPRIEDADES COM
FALHAS REPRODUTIVAS EM ÉGUAS**

**CURITIBA
2013**

RENATA AZEVEDO DE ABREU

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora* sp. e *Toxoplasma gondii* E
SUA INVESTIGAÇÃO NO SÊMEN DE GARANHÕES EM PROPRIEDADES COM
FALHAS REPRODUTIVAS EM ÉGUAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre no curso de
Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos
e Biotecnologia, Área de Concentração: Saúde
Animal e Humana, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Co-orientadora: Prof.^aDr.^a Vanete Thomaz Soccol

**CURITIBA
2013**

**Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais,
Nilza e Antonio, pelo incentivo e apoio em todas as minhas
escolhas e decisões, pelo amor, dedicação e companheirismo.**

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida e por me proporcionar mais uma grande conquista.

Agradeço aos meus pais, Antonio Lopes de Abreu e Nilza Azevedo de Abreu, e ao meu irmão Renan Lopes de Abreu, pela família, amor, confiança e compreensão nos momentos difíceis. Por estarem sempre presentes mesmo a alguns quilômetros de distância. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Romildo Romualdo Weiss pela oportunidade, orientação, conselhos, compreensão e por todos os ensinamentos transmitidos durante esses anos, desde a graduação.

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol pelos ensinamentos, apoio, incentivo, pelas orientações com as PCRs e pelas correções que certamente enriqueceram mais esse trabalho.

À Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich pelas correções, orientação, incentivo, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização de parte desse projeto, por sempre estar disposta a ajudar e pelo tempo analisando os resultados das IFIs comigo.

À Professora Dra. Magda Costa Ribeiro pela atenção e pela ajuda com o alinhamento das sequências.

À Silvana Maria Alban, uma pessoa muito especial que adorei conhecer. Agradeço muito por toda paciência, dedicação e ajuda em todas as etapas realizadas no laboratório de Biologia Molecular da UFPR, e principalmente com as PCRs, sempre tentando resolver os problemas e dizer que tudo daria certo.

Ao funcionário Valter Antonio de Baura do departamento de Bioquímica da UFPR, que ajudou na etapa do sequenciamento, confirmando os resultados. Obrigada pela paciência e atenção.

À todos pós-graduandos do programa, em especial aos colegas Allan Panisson, Camila Pereira, Denise Kitamura, Dérick Rocumback, Fernanda Vasconcellos, Juliana Seger, Michelle Tanoue, Paulo Urbano, Rafaela Fogaça e Ricardo Fendrich, pela companhia, amizade e apoio .

Às minhas amigas queridas Joelma Leão e Ludmilla Troiano, pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer e que se tornaram indispensáveis na minha vida, muito obrigada pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos conselhos, pelas risadas, com certeza esse é só o começo de uma grande amizade.

À todos do laboratório de Patologia Clínica do HV da UFPR, em especial ao Bruno de Queiroz Castilhos e à Marília de Oliveira Koch, que eram residentes do laboratório na época e me ajudaram bastante quando comecei com as IFIs. A ajuda da Marília com o cultivo foi fundamental. Obrigada pela companhia, amizade, apoio e muitas mas muitas risadas diárias!

Às pós graduandas Melina A. Formighieri Bertol e Aline Silva Fujita, pela companhia nas práticas de docência, apoio, incentivo e amizade.

Às minhas amigas da graduação Annelise Bonfim Kloss, Dévaki Assunção, Kerriel Green, Mariana Galvão Kloss, Paola Stramandinoli Branco e Suelen Grazielle Soares, que mesmo não nos vendo sempre, me apoiaram e me incentivaram. Obrigada pela amizade, compreensão, conselhos e risadas.

À minha irmã de coração Dayany Christina Vieira, por ser mais que uma amiga, por ter me acolhido quando vim morar em Curitiba, por compartilhar todos os momentos comigo desde a graduação e por ser uma excelente vizinha de quarto. Amo você!

Aos meus novos amigos Andressa Peters, Caroline Niehues, Henrique Oda, Mariana Casagrande e Vívian Lorenski, que com certeza me ajudaram muito nos momentos difíceis, sempre me incentivando e apoiando, muito obrigada pela amizade.

Às alunas que fizeram iniciação científica, que de alguma forma ajudaram, Ana Claudia Abreu, Ana Paula Marinho e Marina da Rosa Kezyk.

Aos animais, pois sem eles não seria possível realizar esse trabalho.

Às pessoas do meu convívio e familiares que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho. Além dos já mencionados anteriormente, não posso deixar de agradecer à Claudia Fernanda Beserra, Damaris Ferreira de Souza, Fabiana Tiemi, Jorge Lopes de Abreu, Luís Miguel Buchir, Maria de Lourdes Azevedo Guerize, Maria Regina Fernandes Azevedo, Neide Azevedo Melo, Neusa Azevedo Batista e Rosângela Gomes de Azevedo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti por terem gentilmente cedido as células Vero utilizadas neste trabalho, e em especial, à Médica Veterinária Mara Eliza Gasino Joineau pela atenção e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À todos muito obrigada!

“Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.
O futuro mais brilhante
é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida
quando perdoar os erros
e as decepções do passado.
A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar
porque um belo dia se morre”.

(CLARICE LISPECTOR)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS.....	14
LISTA DE SÍMBOLOS.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 ABORTO EM ÉGUAS	22
3.2 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DO ABORTO.....	23
3.3 PRINCIPAIS CAUSAS DE ABORTO POR PROTOZOÁRIOS E VÍRUS EM ÉGUAS	26
3.3.1 Neosporose equina.....	26
3.3.1.1 Etiologia.....	26
3.3.1.2 Ciclo de vida e formas de transmissão.....	26
3.3.1.3 Patogenia e sinais clínicos.....	31
3.3.1.4 Diagnóstico.....	32
3.3.1.4.1 Reação da Polimerase em Cadeia- PCR.....	33
3.3.2 Toxoplasmose	34
3.3.2.1 Etiologia.....	34
3.3.2.2 Ciclo de vida e formas de transmissão.....	35
3.3.2.3 Patogenia e sinais clínicos.....	37
3.3.2.4 Diagnóstico.....	38
3.3.3 Aborto equino a vírus	39
3.3.3.1 Etiologia.....	39
3.3.3.2 Transmissão.....	40
3.3.3.3 Patogenia e sinais clínicos.....	40
3.3.3.4 Diagnóstico.....	42
3.3.3.5 Controle.....	43
3.3.4 Anemia infecciosa equina	44
3.3.4.1 Etiologia.....	44
3.3.4.2 Transmissão.....	44
3.3.4.3 Patogenia e sinais clínicos.....	45
3.3.4.4 Diagnóstico.....	46
3.3.4.5 Controle.....	48
3.3.5 Arterite viral equina	48
3.3.5.1 Etiologia.....	48
3.3.5.2 Transmissão.....	49
3.3.5.3 Patogenia e sinais clínicos.....	50
3.3.5.4 Diagnóstico.....	52
3.3.5.5 Controle e prevenção.....	53
REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO I	OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. E CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i> EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS E FATORES DE RISCO PARA A SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora</i> sp.....	78
RESUMO.....		79
ABSTRACT.....		80
1 INTRODUÇÃO.....		81
2 MATERIAL E MÉTODOS		84
2.1 ESCOLHA DAS PROPRIEDADES.....		84
2.2 ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO		85
2.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....		87
2.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI.....		87
3 RESULTADOS		89
3.1 SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora</i> sp. E <i>T. gondii</i> NAS ÉGUAS		89
3.2 SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora</i> sp. E <i>T. gondii</i> NOS BOVINOS E CÃES.....		92
4 DISCUSSÃO		95
5 CONCLUSÕES.....		100
6 PERSPECTIVAS.....		101
REFERÊNCIAS		1012
ANEXOS.....		112
CAPÍTULO II	INVESTIGAÇÃO DE <i>Neospora</i> sp. e <i>Toxoplasma gondii</i> NO SÊMEN DE REPRODUTORES EQUINOS ATRAVÉS DO CULTIVO CELULAR E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	114
RESUMO.....		115
ABSTRACT.....		116
1 INTRODUÇÃO.....		117
2 MATERIAL E MÉTODOS		119
2.1 ANIMAIS E ÁREA GEOGRÁFICA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS		119
2.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....		121
2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI.....		122
2.4 COLHEITA DE SÊMEN		122
2.5 PESQUISA DE PROTOZOÁRIOS NO SÊMEN EQUINO.....		123
2.5.1 Cultivo celular		123
2.5.1.1 Cultivo das cepas de <i>N. caninum</i> (NC-1) e de <i>T. gondii</i> (RH).....		124
2.5.1.2 Cultivo celular das amostras de sêmen.....		125
2.5.2 Extração do DNA		125
2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR		126
2.5.3.1 Região Nc5 de <i>N. caninum</i>		126
2.5.3.2 Região ITS1.....		128
2.5.3.3 Região 18S.....		130
2.5.4 Identificação dos produtos da PCR.....		131
2.5.5 Purificação dos produtos amplificados.....		131
2.5.6 Sequenciamento.....		132
2.5.7 Análise das sequências		132
3 RESULTADOS		132

3.1 SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora</i> sp. E <i>T. gondii</i> NOS REPRODUTORES EQUINOS	132
3.2 CULTIVO DAS CEPAS DE <i>N. caninum</i> (NC-1) E DE <i>T. gondii</i> (RH).....	132
3.3 CULTIVO CELULAR DAS AMOSTRAS DE SÊMEN.....	133
3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR.....	133
3.5 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	136
4 DISCUSSÃO	139
5 CONCLUSÃO	143
6 PERSPECTIVAS.....	144
REFERÊNCIAS	145
ANEXOS.....	153

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 -	CICLO DE VIDA DO <i>N. caninum</i>	28
FIGURA 2 -	ESQUEMA DE REPRODUÇÃO DE <i>N. caninum</i> POR ENDODIOGENIA.....	29
FIGURA 3 -	CICLO DE VIDA DO <i>T. gondii</i>	36

CAPÍTULO I OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. E CONTRA *Toxoplasma gondii* EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS E FATORES DE RISCO PARA A SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp.

FIGURA 1 -	MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES.....	86
FIGURA 2 -	MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES.....	87
FIGURA 3 -	SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. E CONTRA <i>T. gondii</i> EM ÉGUAS COM FALHAS REPRODUTIVAS, BOVINOS E CÃES DA PROPRIEDADE 2.....	93
FIGURA 4 -	A MÉDIA DA SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora</i> sp. EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS NAS PROPRIEDADES COM CÃES (1, 2, 3 E 4) E SOROPREVALÊNCIA DE <i>Neospora</i> sp. EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS NA PROPRIEDADE SEM CÃES (5).....	94

CAPÍTULO II INVESTIGAÇÃO DE *Neospora* sp. E *Toxoplasma gondii* NO SÊMEN DE REPRODUTORES EQUINOS ATRAVÉS DO CULTIVO CELULAR E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

FIGURA 1 -	MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES.....	120
FIGURA 2 -	MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES.....	121
FIGURA 3 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO Nc5 DE <i>N. caninum</i> UTILIZANDO OS INICIADORES Np6 E Np21.....	134

FIGURA 4 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1 UTILIZANDO OS INICIADORES ITS2 E ITS5.....	134
FIGURA 5 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S UTILIZANDO OS INICIADORES FE/RE E FE/RI DAS AMOSTRAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN.....	135
FIGURA 6 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S UTILIZANDO OS INICIADORES FE/RE E FE/RI DAS AMOSTRAS DO SÊMEN <i>IN NATURA</i>	135
FIGURA 7-	DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DO ABORTO EM ÉGUAS.....	158

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. E CONTRA *Toxoplasma gondii* EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS E FATORES DE RISCO PARA A SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp.

TABELA 1 -	LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES AVALIADAS.....	86
TABELA 2 -	NÚMERO DE EQUINOS, CÃES E BOVINOS ANALISADOS POR PROPRIEDADE.....	86
TABELA 3 -	SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. E CONTRA <i>T. gondii</i> NAS ÉGUAS EXAMINADAS POR PROPRIEDADE.....	89
TABELA 4 -	SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS, PROVENIENTES DAS CINCO PROPRIEDADES ANALISADAS NOS ESTADOS DO PARANÁ E DE SANTA CATARINA.....	90
TABELA 5 -	FALHAS REPRODUTIVAS E RESULTADOS SOROLÓGICOS NA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. E CONTRA <i>T. gondii</i> NAS ÉGUAS EM CADA PROPRIEDADE AVALIADA.....	91
TABELA 6 -	SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>N. caninum</i> E CONTRA <i>T. gondii</i> DOS BOVINOS DA PROPRIEDADE 2 E DOS CÃES DAS PROPRIEDADES 1, 2, 3 E 4 ANALISADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	92
TABELA 7 -	SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. EM ÉGUAS PROVENIENTES DAS CINCO PROPRIEDADES ANALISADAS, DE ACORDO COM PRESENÇA OU NÃO DE CÃES NA PROPRIEDADE.....	93
TABELA 8 -	FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Neospora</i> sp. EM ÉGUAS PROVENIENTES DAS CINCO PROPRIEDADES ANALISADAS, DE ACORDO COM PRESENÇA OU NÃO DE BOVINOS NA PROPRIEDADE.....	94

CAPÍTULO II INVESTIGAÇÃO DE *Neospora* sp. E *Toxoplasma gondii* NO SÊMEN DE REPRODUTORES EQUINOS ATRAVÉS DO CULTIVO CELULAR E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

TABELA 1 -	LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES AVALIADAS.....	120
TABELA 2 -	IDENTIFICAÇÃO DOS REPRODUTORES EQUINOS AVALIADOS E DAS RAÇAS DOS ANIMAIS.....	121
TABELA 3 -	CARACTERÍSTICAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA PCR PARA PESQUISA DE <i>N. caninum</i>	127
TABELA 4 -	COMPONENTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>N. caninum</i> E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM UMA REAÇÃO COM OS <i>PRIMERS</i> Np6/Np21.....	127
TABELA 5 -	COMPONENTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1 E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM UMA REAÇÃO COM OS <i>PRIMERS</i> ITS5/ITS2.....	129
TABELA 6 -	COMPONENTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM UMA REAÇÃO COM OS <i>PRIMERS</i> FE/RE E FE/RI.....	130
TABELA 7 -	SEQUÊNCIAS CONSENSO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN.....	137
TABELA 8 -	SEQUÊNCIAS CONSENSO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S DAS AMOSTRAS DO SÊMEN <i>IN NATURA</i>	138

LISTA DE SIGLAS

AVE	- Arterite Viral Equina
CDME	- Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti
CNA	- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DPI	- Dias pós-inoculação
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
EUA	- Estados Unidos da América
FAO	- “Food and Agriculture Organization of United Nations”
HVE	- Herpes Vírus Equino
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA	- Imunodifusão em Gel de Ágar
IA	- Inseminação Artificial
IFI	- Imunofluorescência indireta
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
ITS1	- “Internal Transcribed Spacer”
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAD	- Teste de Aglutinação Direta Modificada
MEM	- Meio Essencial Mínimo
NCBI	- “National Center for Biotechnology Information”
OIE	- Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	- Tampão salina fosfato
PCR	- “Polymerase Chain Reaction”
PR	- Paraná
RIFI	- Reação de Imunofluorescência indireta
RNA	- Ácido ribonucléico
SC	- Santa Catarina
SNC	- Sistema Nervoso Central
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultravioleta
VAIVE	- Vírus da Anemia Infecciosa Equina
VAVE	- Vírus da Arterite Viral Equina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- grau centígrado
%	- porcentagem
mm ³	- milímetro cúbico
mM	- milimolar
μL	- microlitro
μm	- micrômetro
μM	- micromolar
M	- molar
X ²	- qui quadrado

RESUMO

A perda da prenhez é uma das principais causas de prejuízo econômico em uma criação de equinos. As causas de aborto podem ser de origem não infecciosa ou infecciosa. A disseminação de bactérias, vírus e protozoários pode ocorrer através do sêmen e o garanhão pode ser um portador assintomático de agentes patogênicos que causam perdas reprodutivas em éguas. Entre as causas infecciosas, o aborto causado por protozoários, principalmente por *Neospora* sp. raramente é incluído no diagnóstico diferencial das perdas reprodutivas. O presente estudo contém uma revisão de literatura sobre as principais causas de aborto por protozoário e vírus na égua, e dois capítulos com as pesquisas realizadas. No capítulo 1 está o estudo sobre a ocorrência de anticorpos contra *Neospora* sp. e contra *Toxoplasma gondii* em éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas e a presença de cães e bovinos como fatores de risco para a soroprevalência de *Neospora* sp. em éguas. As soroprevalências de *Neospora* sp. foram 25,71% (9/35), nas éguas com histórico de falhas reprodutivas, e 6,49% (5/77), nas éguas sem histórico de falhas reprodutivas. Através do teste qui-quadrado, com um nível de significância de $\alpha=0,05$, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas e a soroprevalência de *Neospora* sp. As soroprevalências de *T. gondii* foram de 2,85% (1/35), nas éguas com histórico de falhas reprodutivas e de 1,29% (1/77) nas éguas sem histórico de falhas reprodutivas. Não foi observada diferença estatística significativa entre a presença de cães e a soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas. A presença de bovinos foi considerada como fator de risco para *Neospora* sp. nas éguas, com diferença estatística significativa em relação à presença destes animais e a soropositividade ao parasita nas éguas ($X^2= 9,3414$; $p = 0,00224$). No capítulo dois, um estudo inédito foi realizado sobre a investigação dos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* em amostras de sêmen de reprodutores equinos através do cultivo celular e da reação em cadeia da polimerase (PCR). As colheitas de sêmen foram realizadas de oito garanhões, clinicamente saudáveis, através da vagina artificial. Os ejaculados foram centrifugados e a porção contendo os espermatozóides foi recuperada, sendo uma parte inoculada no cultivo celular com células Vero, e a restante mantida a -20°C até o momento da extração de DNA, realizada pelo método de fenol-clorofórmio. As amostras obtidas do cultivo celular do sêmen e do sêmen *in natura* foram submetidas à amplificação por PCR, utilizando iniciadores que delimitam o segmento de DNA da região Nc5 de *N. caninum* (Np6/Np21), da região ITS1 (ITS2/ITS5) e da região 18S (FE/RE; FE/RI). Não foi verificado o crescimento de protozoários no cultivo celular do sêmen. Apenas para a região 18S ocorreu amplificação de DNA das amostras obtidas do cultivo celular do sêmen e do sêmen *in natura*. As amostras foram sequenciadas e as sequências obtidas do cultivo celular do sêmen foram compatíveis com *Acanthamoeba rhysodes* e *A. castellanii*. Os protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* não foram encontrados no sêmen dos reprodutores avaliados. Os protozoários encontrados neste estudo podem ser provenientes do ambiente e estarem presentes no prepúcio, contaminando o sêmen. A presença destes agentes e suas consequências na reprodução em equinos até hoje é desconhecida.

Palavras- chave: *Neospora* sp. *Toxoplasma gondii*. Falha reprodutiva. Equinos.

ABSTRACT

Abortion is one of the major factors contributing to infertility in equine species, representing one of the most important economic problems for horse breeders. The causes of abortions may be infectious or non-infectious in origin. Bacteria, viruses and protozoa can also be disseminated through semen and the stallion may be an asymptomatic carrier of diseases causing reproductive failure in mares. In addition to infectious origins, abortion caused by protozoa, mainly by *Neospora* sp. is rarely included in the differential diagnosis of reproductive failure. This study contains a literature review of the main causes of abortion caused by protozoas and viruses in mares, and two chapters with surveys undertaken. Chapter 1 of this study addresses the occurrence of antibodies against *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* in mares with and without a history of reproductive failure and the presence of dogs and cattle as risk factors for seroprevalence of *Neospora* sp. in mares. In mares with a history of reproductive failure seroprevalence obtained for *Neospora* sp. was 25.71% (9/35) and in mares with no history of reproductive failure corresponded to 6.49% (5/77). Utilizing the chi-square test, ($\alpha = 0.05$), a significant difference between mares with and without a history of reproductive failure was noted as well as the seroprevalence for *Neospora* sp. The seroprevalence of *T. gondii* was 2.85% (1/35) in mares with a history of reproductive failure and 1.29% (1/77) in mares with no history of reproductive failure. There was no statistically significant difference between the presence of dogs and the seroprevalence of *Neospora* sp. in mares. The presence of cattle was considered as a risk factor to *Neospora* sp. in mares, with a statistically significant difference regarding the presence of these animals and seropositive of this parasite in mares ($X^2 = 9.3414$, $p = 0.00224$). In chapter two, an original research paper was conducted to determine the presence of the protozoa *Neospora* sp. and *T. gondii* in semen samples from stallions from properties with a history of reproductive failure and mares seropositive for *Neospora* sp. and *T. gondii*, through the cell culture and polymerase chain reaction (PCR). The semen samples were collected from eight stallions, clinically healthy with an artificial vagina. One ejaculate was collected from each animal and analyzed. Ejaculates were centrifuged and the portion containing the sperm cells were recovered and inoculated with cell culture in Vero cells, and the rest kept at -20°C until DNA extraction by the method of phenol-chloroform. The samples obtained from cell cultures of semen and semen *in natura* were submitted to PCR amplification using *primers* that define the DNA segment Nc5 of the region of *N. caninum* (Np6/Np21), ITS1 (ITS2/ITS5) and 18S (FE/RE; FE/RI). The protozoan was not detected in cell culture of the semen samples. Only for the 18S region DNA was amplified from samples obtained from cell cultures of semen and from semen *in natura*. The samples were sequenced and sequences obtained from cell cultures of semen were consistent with *Acanthamoeba rhyodes* and *A. castellanii*. The protozoan *Neospora* sp. and *T. gondii* were not found in the semen of the stallions evaluated. The protozoa found in this study may come from the environment and be present on the prepuce, contaminating the semen. The presence of these agents and their effects on reproduction in horses is unknown until today.

Keywords: *Neospora* sp. *Toxoplasma gondii*. Reproductive failure. Equine.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A equideocultura no Brasil tem um papel importante como fonte geradora de renda e trabalho. O setor emprega cerca de 640 mil pessoas diretamente e realiza uma movimentação econômica superior a R\$ 7,3 bilhões anuais (CNA, 2006). O rebanho de equinos no Brasil é o quarto maior do mundo (FAO, 2010), com 5,5 milhões de animais (IBGE, 2010). A reprodução é imprescindível para o sucesso de uma criação de equinos.

A perda da prenhez é um dos principais fatores de subfertilidade na espécie equina, podendo ser dividida em morte embrionária e morte fetal. As perdas relacionadas com aborto e mortalidade perinatal, tanto natimortos como morte neonatal precoce, estão entre as principais causas de prejuízo econômico numa criação de equinos (LAUGIER *et al.*, 2011).

As causas de aborto podem ser de origem infecciosa ou não infecciosa. Determinar a sua causa nem sempre é possível. Estudos realizados anteriormente demonstraram uma variação no percentual de abortos de etiologia desconhecida de 16 - 54% (ACLAND, 1993; GILES *et al.*, 1993; HONG *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 1998; BLANCHARD *et al.*, 2003, LAUGIER *et al.*, 2011; MARENZONI *et al.*, 2012; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2012).

Os principais agentes infecciosos são vírus, bactérias, fungos, além de micoplasmas e protozoários (ACLAND, 1993). As causas não infecciosas são gestação gemelar, torção do cordão umbilical, separação prematura da placenta, atrofia ou hipoplasia do vilos da placenta, malformação congênita, gestação no corpo uterino, estresse materno, má nutrição, problemas de ordem hormonal, entre outros (ACLAND, 1993; BLANCHARD *et al.*, 2003). Muitos fatores não infecciosos podem predispor a égua e o feto a doenças infecciosas e algumas doenças infecciosas podem predispor a égua e o feto a microrganismos oportunistas (SWERCZEK, 1991; MOREIRA *et al.*, 1998).

O aborto causado por protozoário não é comum em equinos, principalmente quando comparado com bovinos (LU *et al.*, 2006). A neosporose é reconhecida em todo o mundo como uma importante causa de aborto em bovinos (LOCATELLI-

DITTRICH, 2002; PARKINSON; BARRET, 2009). *Neospora* sp. é um protozoário apicomplexa, parasita intracelular obrigatório (ANDERSON *et al.*, 2000), cujas características biológicas e morfológicas estão estreitamente relacionadas com os gêneros *Toxoplasma* e *Sarcocystis*. É um protozoário distribuído mundialmente, capaz de infectar ampla variedade de hospedeiros (DUBEY, 2003).

Neospora caninum e *Neospora hughesi* infectam equinos, sendo que a infecção por *N. caninum* tem sido associada a problemas reprodutivos e doença neonatal, e a infecção por *N. hughesi* a distúrbios neurológicos (LINDSAY, 2001; KLIGLER *et al.*, 2007; VERONESI *et al.*, 2008).

A transmissão de *N. caninum* pode acontecer por transmissão horizontal, através da ingestão de oocistos que são eliminados pelo hospedeiro definitivo ou pela ingestão de tecidos com cistos contendo bradizoítas, ou vertical, através da transmissão transplacentária (DUBEY *et al.*, 2007; ANTONELLO *et al.*, 2012). Dubey e Porterfield (1990) e Locatelli-Dittrich (2002) detectaram *Neospora* sp. em fetos equinos abortados, alguns estudos demonstraram a associação da neosporose com perda fetal (McDOLE; GAY, 2002; VILLALOBOS *et al.*, 2006; KLIGLER *et al.* 2007; VERONESI *et al.*, 2008).

Estudos realizados no Brasil encontraram índices variados de soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* sp. em equinos 2,5 a 47% (HOANE *et al.*, 2006; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006a; VILLALOBOS *et al.*, 2006). Até o momento continua incerto se *N. caninum* infecta equinos porque ocorre reação cruzada com *N. hughesi*. Os três isolados viáveis de *Neospora* de cavalos foram identificados como *N. hughesi* (DUBEY; SCHARES, 2011).

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, os hospedeiros definitivos são os felídeos, domésticos e selvagens, pois só neles ocorre o ciclo sexuado do parasito, com a eliminação de oocistos que no ambiente esporulam e se tornam infectantes (KAWAZOE, 2005). É uma das zoonoses parasitárias mais comuns, apresenta ampla distribuição geográfica (HILL *et al.*, 2002).

Os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes à infecção pelo parasita *T. gondii* e apesar de não ser muito frequente podem apresentar alguns sinais clínicos, caracterizados por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e aborto (TURNER; SAVVA, 1991).

No Brasil, a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em equinos clinicamente sadios variou de 2,7%, no Paraná (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006) a 41,5%, no estado de São Paulo (VIDOTTO *et al.*, 1997). Em equinos com histórico de ataxia a prevalência de *T. gondii* foi de 34,78% (STELMANN *et al.*, 2011).

No Brasil são frequentes os casos de abortos em éguas sem diagnóstico definitivo, e a neosporose não é incluída como rotina nos exames laboratoriais (LOCATELLI-DITTRICH, 2002; HOFFMANN, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a escassez de dados sobre a infecção por *Neospora* sp. e as consequências da presença deste agente em populações equinas do Brasil, este estudo visou verificar a associação entre soropositividade aos protozoários *Neospora* sp. e *Toxoplasma gondii* e a ocorrência de falhas reprodutivas em éguas, provenientes de propriedades localizadas nos estados do Paraná e de Santa Catarina, e avaliar a presença dos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen de reprodutores equinos de propriedades com falhas reprodutivas e éguas soropositivas para *Neospora* sp. e *T. gondii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar propriedades com histórico de falhas reprodutivas em éguas, sem diagnóstico conclusivo.
- Determinar a soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* sp. e contra *Toxoplasma gondii* em equinos, e em cães e bovinos, dessas propriedades, através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI).
- Verificar a associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora* sp. e a perda reprodutiva em éguas.
- Verificar a associação entre soropositividade ao protozoário *T. gondii* e a perda reprodutiva em éguas.
- Relacionar a presença de cães e de bovinos como fatores de risco para a soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas.
- Inocular em cultivo celular sêmen equino, verificando o crescimento de protozoário.
- Verificar a presença do protozoário *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen inoculado em cultivo celular e do sêmen *in natura*, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) .

O presente estudo fará inicialmente uma breve abordagem sobre as principais causas de aborto por protozoários e vírus em éguas. Posteriormente, serão apresentados dois capítulos com os resultados das pesquisas realizadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ABORTO EM ÉGUAS

O aborto refere-se a todas as perdas gestacionais durante o estágio fetal, na espécie equina, é a partir do 40º dia, quando a organogênese está completa, até 300 dias de gestação, de acordo com *Working Party on Terminology* (1982). Abortos antes dos quatro meses de gestação são difíceis de serem observados a campo, uma vez que os tecidos fetais e placentários são pequenos, sendo a maioria dos abortos observados a partir dos seis meses de gestação (BLANCHARD *et al.*, 2003). A mortalidade perinatal refere-se aos natimortos, ocorrendo o aborto após 300 dias de gestação e a morte neonatal precoce, antes dos sete dias de vida (ACLAND, 1993; BLANCHARD *et al.*, 2003; MARENZONI *et al.*, 2012).

Estudos sobre as causas de aborto em éguas nos Estados Unidos, França e Itália, revelaram que 33,8 - 63,7% são de origem infecciosa, enquanto que 27,2 - 50,2 % são de origem não infecciosa (GILES *et al.*, 1993; LAUGIER *et al.*, 2011; MARENZONI *et al.*, 2012). As causas de aborto podem variar com o tempo, como um reflexo da melhora na capacidade de diagnóstico ou por causa das diferenças regionais entre as populações de equinos (LAUGIER *et al.*, 2011; MARENZONI *et al.*, 2012). É importante estabelecer o diagnóstico para poder evitar outras perdas e, também, determinar medidas de controle e profilaxia.

Laugier *et al.* (2011) na França, num período de 24 anos, encontraram 63,7% (n=869) dos abortos diagnosticados por infecção feto-placentária, dos quais 79,9% eram causados por bactérias, 15,1%, por vírus, e 1,8%, por fungos. As causas não infecciosas corresponderam a 27,2% dos casos, sendo que anormalidades no cordão umbilical representaram 60,5%. Similarmente, Smith *et al.* (2003), no Reino Unido, relataram que 35,7% (485/1252) das perdas de prenhez estavam relacionadas com torção umbilical.

No Brasil, Moreira *et al.* (1998) investigaram as causas de aborto em éguas, predominantemente da raça Puro Sangue Inglês, na região metropolitana de Curitiba. Em um período de três anos, 674 gestações foram acompanhadas e o índice de aborto encontrado foi 9,2%. A gestação gemelar representou 4,5%, em um

total de 132 casos analisados. De 38 fetos encaminhados para a bacteriologia, 44,7% foram positivos, sendo as bactérias com maior frequência isoladas: *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp. O Herpesvírus equino tipo 1 foi isolado em 19,0% dos casos (4/21).

No Rio Grande do Sul, Marcolongo-Pereira *et al.* (2012) encontraram 36,1% (26/72) dos casos de aborto relacionados com infecção bacteriana, sendo *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira* sp. e *Streptococcus β hemolítico* as mais frequentes; 4,2% (3/72), por infecção por Herpes Vírus Equino tipo 1; 1,4% (1/72), por *Babesia equi*; 2,8% (2/72), por causas inflamatórias com o agente não identificado e 8,3% (6/72), por causas não infecciosas. Neste estudo, em 47,2% (34/72) dos casos não foi possível determinar o agente etiológico, devido, em parte, ao envio de material de forma inadequada.

3.2 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DO ABORTO

Para o correto diagnóstico do aborto uma anamnese detalhada deve ser realizada incluindo o histórico reprodutivo da égua, estágio da prenhez em que ocorreu o aborto, sinais clínicos observados antes ou depois do aborto, contato com outras éguas que abortaram, vacinações, ocorrência de doenças na propriedade, trânsito de animais, possíveis causas de estresse materno, fonte de água e alimento. Um exame clínico ginecológico da égua após o aborto também deve ser realizado (BLANCHARD *et al.*, 2003).

A probabilidade da causa do aborto ser determinada é sempre maior quando o feto e a placenta são encaminhados imediatamente para o laboratório (SMITH, 2003), sendo armazenados em sacos plásticos e transportados refrigerados, não congelados. Cada aborto deve ser considerado como uma fonte potencial de infecção para outras éguas prenhes, até que se prove o contrário (BLANCHARD *et al.*, 2003). O feto deve ser encaminhado para necropsia, a condição nutricional, o comprimento do cordão umbilical e o comprimento do feto também devem ser avaliados (ACLAND, 1993).

Se não for possível enviar o feto e a placenta inteiros, um exame *post-mortem* deve ser realizado a campo e fragmentos devem ser colhidos de forma asséptica e encaminhados para o laboratório em frascos esterilizados. Para realização dos exames de bacteriologia e micologia, devem-se encaminhar fragmentos da placenta, fígado, rim, conteúdo estomacal, pulmão, cérebro e *swabs* do alantocórion. Para virologia, encaminham-se fragmentos da placenta, baço, fígado, linfonodo, adrenal, pulmão, timo e alantocórion. Fragmentos dos mesmos órgãos e do coração, do alantocórion e do cordão umbilical, poderão ser fixados em solução de Bouin ou em formol a 10% para exame histopatológico (ACLAND, 1993; LAUGIER *et al.*, 2011).

O soro fetal e o líquido peritoneal podem ser submetidos ao exame sorológico, com amostras pareadas de soro da égua, coletadas no momento do aborto e entre 2 a 3 semanas após. O aumento ou declínio do título de anticorpos para um determinado agente infeccioso, após o aborto, pode fornecer evidências sobre a causa do mesmo. A interpretação dos dados sorológicos é mais confiável quando os dados citológicos, microbiológicos e histológicos são também considerados (BLANCHARD, 2003).

Dennis (1981) classificou os fetos abortados em três categorias: (a) aqueles sem evidência de infecção; (b) aqueles com evidência de infecção; e (c) aqueles que estão muito autolisados para serem avaliados. As lesões detectadas em fetos abortados estão associadas com o tempo de morte fetal. Fetos abortados entre quatro e seis meses de gestação apresentam-se, geralmente, autolisados, sendo a causa, na maioria das vezes, septicemia bacteriana. Enquanto que fetos abortados entre seis e oito meses de gestação estão menos autolisados e as lesões encontradas na placenta são mais distintas. Já fetos abortados com mais de oito meses de gestação estão mais imunocompetentes, permitindo a ocorrência de reações inflamatórias e são susceptíveis de serem acompanhados por lesão placentária aparente, se esta estiver envolvida, bem como lesão fetal evidente (BLANCHARD, 2003).

A placentite é a lesão mais comum encontrada no aborto por causa infecciosa (BLANCHARD, 2003). A placentite na égua normalmente é causada pela infecção ascendente, que penetra no útero através da cérvix (TROEDSSON *et al.*, 1997; TROEDSSON, 2003). Os isolados bacterianos da placentite, na maioria das vezes,

são isolados do trato genital externo (HONG *et al.*, 1993). A infecção via hematógena ocorre em menor grau do que a rota ascendente (TROEDSSON, 2003).

Sinais clínicos sugestivos de placentite na égua são desenvolvimento do úbere, lactação prematura, abertura da cérvix, secreção vaginal ou aborto espontâneo (McKINNON *et al.*, 2007). A avaliação da placenta através da ultrassonografia permite detectar espessura anormal do útero e placenta, e separação prematura do alantocórion do endométrio, em éguas com sinais clínicos de placentite. Em estágios avançados, o espaço entre o útero e a placenta é preenchido com fluido hipercóico (TROEDSSON *et al.*, 2000). O diagnóstico definitivo é realizado através de exame macroscópico da placenta, cultura bacteriológica e exame histopatológico do alantocórion e do feto abortado (RENAUDIN *et al.*, 1997; TROEDSSON *et al.*, 1997).

Os sinais macroscópicos sugerindo infecção intrauterina do feto incluem: desenvolvimento incompleto, edema, coágulos ou placas de fibrina na cavidade serosa, focos necróticos no fígado e outros órgãos, graus variáveis de autólise. Lesões microscópicas associadas com infecção intrauterina são encontradas mais frequentemente na placenta, fígado, pulmões e intestino fetais (BLANCHARD, 2003).

Técnicas de biologia molecular têm sido amplamente aplicadas, tanto no diagnóstico de doenças infecciosas como parasitárias (YANG *et al.*, 2004). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido recentemente utilizada em estudos sobre causas de aborto em éguas, principalmente para pesquisa de herpes vírus equino tipo 1, herpes vírus equino tipo 4, arterite viral equina, *Leptospira interrogans*, anemia infecciosa equina, *Neospora* sp. (VERONESI *et al.*, 2008; MARENZONI *et al.*, 2012; LAUGIER *et al.*, 2011).

O diagnóstico etiológico do aborto em éguas está apresentado em fluxograma na figura 7, encontrado no Anexo 4 do Capítulo II.

3.3 PRINCIPAIS CAUSAS DE ABORTO POR PROTOZOÁRIOS E VÍRUS EM ÉGUAS

3.3.1 Neosporose Equina

3.3.1.1 Etiologia

O protozoário do gênero *Neospora* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, onde também são classificados os gêneros *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Besnoitia* (DUBEY; LINDSAY, 1996). Duas espécies são descritas no gênero *Neospora*: *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988) e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998). *Neospora caninum* é morfologicamente similar a outros protozoários do grupo Apicomplexa que provocam doenças sistêmicas em muitos animais como: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni*, *Isospora* spp., *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis canis* (DUBEY *et al.*, 2002).

3.3.1.2 Ciclo de vida e formas de transmissão

O ciclo de vida do *N. caninum* é heteroxênico, envolvendo de um lado um hospedeiro definitivo carnívoro e de outro lado um hospedeiro intermediário herbívoro. Os hospedeiros definitivos do *N. caninum* são os cães domésticos (McALLISTER, 1998), e alguns canídeos selvagens, como coiotes (GONDIM *et al.*, 2004) e, mais recentemente, dingos (KING *et al.*, 2010) e lobos-cinzentos (DUBEY *et al.*, 2011). E várias espécies como hospedeiros intermediários naturais, entre elas, cães, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, galinhas, cervos, ratos silvestres (*Rattus norvegicus*), raposas (*Vulpes vulpes*) (DUBEY; LINDSAY, 1996; ALMERIA *et*

al., 2002; HUANG *et al.*, 2004; FURUTA *et al.*, 2007). Estima-se que exista uma diversidade de hospedeiros muito maior (DUBEY; SCHARES, 2011).

O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* ainda não foi determinado, assim como outros possíveis hospedeiros intermediários, que não os equídeos, permanecendo incerta a forma de exposição dos cavalos a este parasito (HOANE *et al.*, 2006).

No ciclo biológico de *N. caninum* são identificados basicamente três formas parasitárias, que são as fases infectantes do parasito. São elas: os taquizoítas, os cistos teciduais com bradizoítas e os oocistos (DUBEY *et al.*, 1988; McALLISTER *et al.*, 1998). As formas identificadas do ciclo de vida de *N. hughesi* são os taquizoítas e os cistos teciduais com bradizoítas (MARSH *et al.*, 1996, 1998; DUBEY *et al.*, 2001). Os taquizoítas e os bradizoítas são estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários e definitivos, enquanto os oocistos se desenvolvem apenas nos hospedeiros definitivos, e são excretados junto às fezes destes animais (DUBEY, 2003a).

A transmissão do *N. caninum* ocorre por dois mecanismos: horizontal e vertical (figura 1). A transmissão horizontal é quando os hospedeiros susceptíveis ingerem através da água e alimentos contaminados oocistos esporulados ou através da ingestão de tecidos com cistos contendo bradizoítas. A transmissão vertical ou infecção congênita ou infecção via placentária ocorre quando a mãe transmite a doença para seus descendentes, geração após geração (DUBEY *et al.*, 2007). Essa via de transmissão é a principal forma de transmissão em bovinos e favorece a manutenção ou expansão da infecção no rebanho por sucessivas passagens de geração para geração, mesmo sem a presença do hospedeiro definitivo (DUBEY, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000).

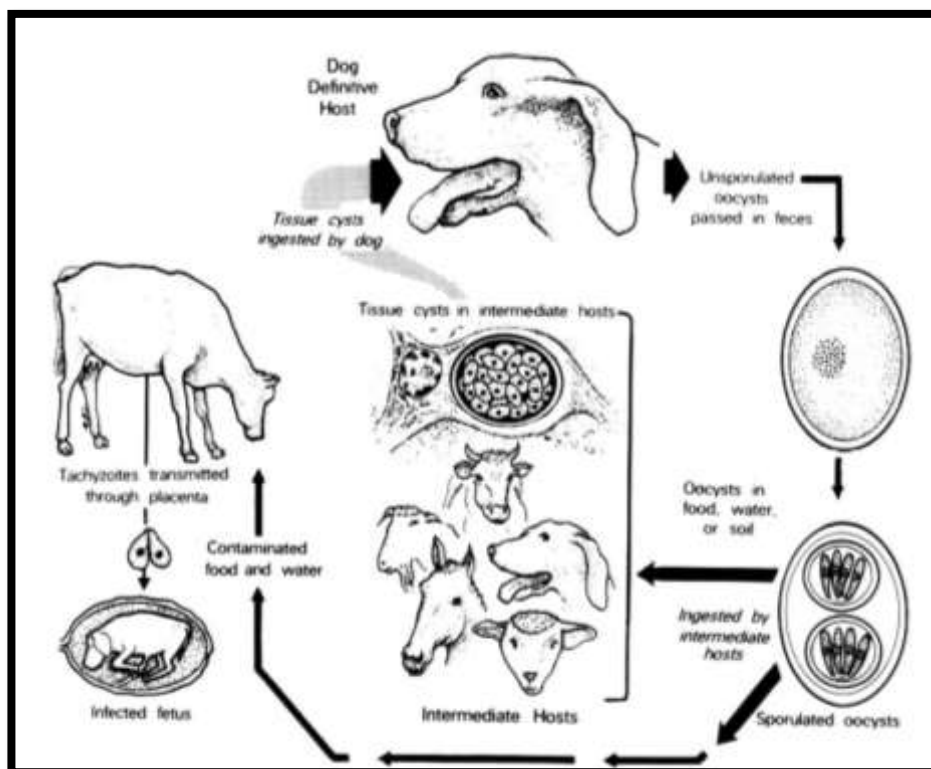


FIGURA 1- CICLO DE VIDA DO *N. caninum*.

FONTE: DUBEY *et al.*, 2007.

A ingestão oral de cistos com bradizoítas por hospedeiros carnívoros promove a diferenciação sexual do parasito nos tecidos intestinais, com a formação de oocistos não esporulados que são excretados nas fezes (DUBEY *et al.*, 2002). Esses oocistos irão esporular no ambiente entre 24 a 72 horas, dependendo de condições de umidade, temperatura e oxigenação. Os cães eliminam os oocistos ao redor do quinto dia pós-ingestão de tecidos de animais experimentalmente ou naturalmente infectados. O número de oocistos eliminados, o período pré-patente e a duração da eliminação variam bastante (GONDIM *et al.*, 2002).

Quando os oocistos são ingeridos por um hospedeiro intermediário, os esporozoítas infectivos são liberados no trato intestinal, penetram nas células e se transformam em taquizoítas, que se dividem rapidamente, lesando as células e disseminando a infecção (LINDSAY *et al.*, 1999b).

A penetração na célula hospedeira ocorre por meio de invasão ativa, podendo começar após cinco minutos de contato com a célula. Os taquizoítas normalmente localizam-se no citoplasma da célula, formando um vacúolo parasitário, podendo

haver mais que um vacúolo por célula (DUBEY *et al.*, 2002). Nesse vacúolo ocorre multiplicação assexuada por endodiogenia, onde são formados dois novos taquizoítas no interior do taquizoíta original, semelhante a um tipo de brotamento interno (figura 2). Essa multiplicação é rápida e ocasiona lise e morte celular favorecendo a disseminação da infecção e determinação da doença (HEMPHILL *et al.*, 1999a). Nos animais infectados os taquizoítas de *N. caninum* foram observados em células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (DUBEY; LINDSAY, 1996). Nos poucos estudos com *N. hughesi*, os taquizoítas foram observados principalmente no cérebro e medula espinhal (DUBEY *et al.*, 2001).

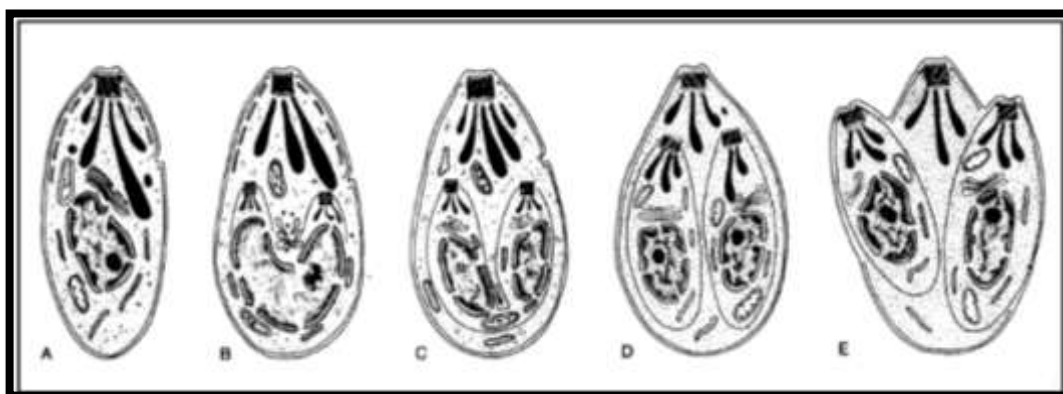


FIGURA 2 - ESQUEMA DE REPRODUÇÃO DE *N. caninum* POR ENDODIOGENIA. A- TROFOZOÍTO; B- INÍCIO COM FORMAÇÃO DE DOIS CONÓIDES FILHOS E O NÚCLEO COM ASPECTO DE UM U; C- COMPLETA DIVISÃO NUCLEAR E INDIVIDUALIZAÇÃO DOS TROFOZOÍTOS FILHOS, PELO CRESCIMENTO DA MEMBRANA EM DIREÇÃO POSTERIOR; C E D- SEPARAÇÃO DE DOIS NOVOS TROFOZOÍTOS, ABANDONANDO OS RESTOS DA CÉLULA MÃE QUE IRÁ DEGENERAR-SE EM SEGUIDA.

FONTE: REY, 2001.

Geralmente, a fase proliferativa, representada pela rápida multiplicação dos taquizoítos, ocasiona uma resposta imune humoral. Assume-se que nessa ocasião os taquizoítos, ao adentrarem uma nova célula hospedeira, sofrem diferenciação em bradizoítos, que são envoltos por uma membrana e originam o cisto tecidual de *N. caninum*. Apresentam multiplicação lenta e podem ser compreendidos como formas de resistência do parasito (DUBEY, 1999b). Os cistos podem persistir no hospedeiro

infectado por vários anos, sem causar nenhuma manifestação clínica (LINDSAY *et al.*, 1996).

O tamanho e a espessura da parede dos cistos são características que podem distinguir os parasitas *N. caninum* e *N. hughesi*. Os cistos teciduais e a espessura da parede de *N. hughesi* são menores que os de *N. caninum*, segundo Marsh *et al.* (1998).

Em equinos, apesar das evidências da infecção transplacentária de *N. caninum* ocorrer desde 1990 (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; LINDSAY *et al.*, 1996; PRONOST *et al.*, 1999; PITEL *et al.*, 2003a), apenas recentemente a transmissão transplacentária de *N. hughesi* foi comprovada (PUSTERLA *et al.*, 2011). Entretanto, a frequência, as consequências e a importância da infecção vertical na manutenção do *Neospora* sp. nos equinos ainda são pouco conhecidos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006a; ANTONELLO *et al.*, 2012).

A presença de DNA de *N. caninum* no sêmen de touros naturalmente infectados foi relatada por Ortega-Mora *et al.* (2003), Caetano-da-Silva *et al.* (2004) e Ferre *et al.* (2004), sugerindo a possibilidade da transmissão venérea da neosporose. Serrano *et al.* (2006) demonstraram que novilhas inseminadas com sêmen contaminado com 10^7 taquizoítas de *N. caninum* apresentaram soroconversão, o parasita foi detectado no sangue e em alguns órgãos (cérebro, fígado, pulmão, útero) através da *nested*-PCR. A taxa de prenhez do grupo infectado foi bem inferior (11,1%) quando comparada com o grupo controle (66,6%), indicando que a transmissão horizontal, através do sêmen é possível. Até o momento, ainda não foi detectado a presença do *Neospora* sp. no sêmen do cavalo.

Existe também a possibilidade de transmissão do parasito entre espécies domésticas e selvagens. A importância dos animais silvestres no ciclo da neosporose, no entanto, ainda não está bem esclarecida (GONDIM *et al.*, 2004; GONDIM, 2006). A infecção de *N. caninum* em roedores selvagens é de considerável importância epidemiológica, pois roedores são animais cosmopolitas, presentes no ambiente urbano, rural e selvagem. São presas naturais de canídeos e podem ser hospedeiros intermediários em potencial (GONDIM, 2006).

A transmissão vertical pela via lactogênica em bezerros foi demonstrada experimentalmente (UGGLA *et al.*, 1998) e a presença de DNA de *N. caninum*

também foi detectado no colostro de vacas infectadas (MOSKWA *et al.*, 2007), indicando a possibilidade de transmissão de *N. caninum* pelo colostro.

3.3.1.3 Patogenia e sinais clínicos

A doença é caracterizada principalmente por aborto, doenças neonatais, e encefalomielite severa (LINDSAY, 2001). Outros sinais clínicos incluem cegueira, anemia, enterite, perda de peso, paralisia dos membros posteriores, comportamento bizarro, dificuldade de mastigação, incoordenação, ataxia (GRAY *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 2000).

Os equinos podem ser infectados por ambas as espécies de *Neospora*, sendo que *N. caninum* que está associado com doenças reprodutivas, como aborto e mortalidade neonatal (PITEL *et al.*, 2003a), e *N. hughesi* está relacionado principalmente, com os casos de Mieloencefalite Protozoária Equina (MEP) (VARDELEON *et al.*, 2001). Embora a exposição ao *Neospora* sp. em equinos pareça ser comum, a doença clínica é rara (LINDSAY, 2001; KLIGLER *et al.*, 2007).

Casos clínicos de MEP, associados ao *N. hughesi*, foram todos descritos nos Estados Unidos (DAFT *et al.*, 1996; MARSH *et al.*, 1996, 1998; CHEADLE *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2001; FINNO *et al.*, 2007; FINNO *et al.*, 2010), com exceção de um caso no Canadá, porém o animal esteve nos Estados Unidos por duas semanas (WOBESER *et al.*, 2009). Um desses casos refere-se a uma mula de 23 anos que apresentava mieloencefalite (FINNO *et al.*, 2010).

Os casos de aborto associados ao *N. caninum* foram descritos nos Estados Unidos (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; LINDSAY *et al.*, 1996) e na França (PRONOST *et al.*, 1999; PITEL *et al.*, 2003; LEON *et al.*, 2011). A infecção neonatal por *N. caninum* foi observada nos Estados Unidos, em um potro de um mês de idade, com cegueira congênita, cistos do protozoário foram observados ao redor da musculatura ocular (LINDSAY *et al.*, 1996). Um caso de neosporose visceral foi descrito em uma égua de dez anos de idade, taquizoítas de *N. caninum* foram encontrados no intestino, cólon e linfonodos mesentéricos (GRAY *et al.*, 1996).

3.3.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado através de métodos parasitológicos ou sorológicos (SILVA, 2005). A confirmação laboratorial de neosporose deve ser realizada preferencialmente pelo diagnóstico parasitológico, com a detecção do parasita nos tecidos, por exames histopatológico, imunohistoquímico, e PCR, ou isolar os parasitas mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório (HEMPHILL *et al.*, 2000; PETERS *et al.*, 2001). O diagnóstico sorológico pesquisa os anticorpos direcionados aos antígenos de superfície dos taquizoítas de *Neospora* sp. no soro dos animais (PETERS *et al.*, 2001). Os testes sorológicos mais utilizados são RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e ELISA (ensaio imunoenzimático), também podem ser utilizados soroaglutinação e Western Blot (HEMPHILL *et al.*, 2000). A presença de anticorpos séricos para *Neospora* sp. indica a exposição ao parasita ou a um parasita estritamente relacionado passível de reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON *et al.*, 2001).

O diagnóstico de aborto por *N. caninum* não deve ser baseado somente no método sorológico (SAGER *et al.*, 2001; PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003). É necessário demonstrar o protozoário no feto e, se possível, incluir as lesões histopatológicas para confirmar o diagnóstico, excluindo outras causas de aborto (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003; DUBEY; SCHARES, 2006). As lesões microscópicas podem ser encontradas em uma variedade de tecidos fetais, mas as observações mais frequentes são encefalite e miocardite multifocal. Em fetos, neonatos bovinos e equinos, áreas de necrose multifocal cercadas por células inflamatórias são observadas geralmente no sistema nervoso central, medula espinhal, coração, músculo esquelético, fígado, pulmão, e placenta (BARR *et al.*, 1991), embora o cérebro seja o órgão mais consistentemente afetado (DUBEY, 2003).

No Brasil, o protozoário *Neospora* sp. deveria ser incluído no diagnóstico de MEP, para se estabelecer a real participação deste parasita nas doenças neurológicas, propiciando novas opções de tratamento e controle da doença (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006b).

3.3.1.4.1 Reação da Polimerase em Cadeia- PCR

A PCR é um método utilizado para amplificar bilhões de vezes o DNA por meio de uma região definida por dois indicadores (*primers*) que são complementares às cadeias opostas do DNA. A enzima envolvida nesta reação é a taq-polimerase, que utiliza o DNA como um molde. Esta técnica permite amplificar sequências de *N. caninum* a partir de DNA de tecidos animais frescos, congelados e emblocados em parafina. Testes utilizados para este propósito incluem PCR convencional, PCR semi-quantitativo, *nested* PCR em tubo único ou PCR seguida por hibridização por sonda (JENKINS *et al.*, 2002).

A sensibilidade e especificidade analíticas da PCR são influenciadas por alguns fatores importantes como o DNA alvo apropriado (genômico ou ribossômico), escolha de *primers* específicos, protocolos adequados para extração de DNA, purificação e armazenamento de DNA molde, tempos e temperaturas de extensão, amplificação e anelamento, uso de reagentes e equipamentos apropriados. Entretanto, apesar da sensibilidade analítica da PCR, a presença do DNA do agente não é suficiente para determinar a neosporose no animal, pois a maioria das infecções ocorre sem a manifestação clínica, sendo necessário associar as lesões histopatológicas características nos tecidos com a presença do parasita (DUBEY; SCHARES, 2006).

Em equinos, Veronesi *et al.* (2008) na Itália, encontraram a presença de DNA de *N. caninum* no cérebro de três fetos abortados e três natimortos, através da *semi-nested* PCR, porém, não obtiveram a comprovação de manifestações patológicas do protozoário nos tecidos destes animais. Assim como Laugier *et al.* (2011), na França, que detectaram DNA de *N. caninum* através da *real-time* PCR em três fetos abortados (0,7%), sendo que em dois casos outros agentes infecciosos também foram detectados. Devido à ausência de lesões características e presença de bactérias, apenas em um caso a provável causa do aborto tenha sido devido ao *N. caninum*.

Os genes alvos mais utilizados na técnica da PCR são as sequências de rDNA (18S rDNA, 28S rDNA, ITS1) e o gene pNc5. Os iniciadores para as sequências do gene pNc5 são o Np6 e Np21 (YAMAGE *et al.*, 1996). Vários

protocolos de PCR têm sido desenvolvidos nos últimos anos, visando detectar a região ITS1 do parasito e a sequência Nc5 específica de *Neospora*, com diferentes modificações, como *nested* ou *hemi-nested* PCR, na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica, com diferentes resultados obtidos (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2002).

Os estudos moleculares de *N. hughesi* demonstraram que não existem diferenças entre as sequências do gene da pequena subunidade ribossomal do RNA, de *N. hughesi* e *N. caninum*. A comparação das regiões ITS1 do DNA dos parasitas revelou diferenças entre a sequência dos nucleotídeos de *N. hughesi* e de *N. caninum*. A sequência da região ITS1 do DNA do *N. hughesi* é 98% similar à sequência de *N. caninum* (MARSH *et al.*, 1998).

A similaridade genômica entre as espécies apicomplexa (*N. caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Hammondia heydorni*) tem incentivado a pesquisa e o desenvolvimento de PCR específico por espécie. Esta caracterização molecular vem sendo realizada com o sequenciamento dos ITS1 do DNA, permitindo discriminar a variabilidade inter e intraespécie. O uso da região ITS1 do DNA garante a especificidade do teste na detecção de *N. caninum*, tendo sido confirmada pela análise do BLAST que os *primers* da região ITS1 empregados na *nested* PCR são específicos para este parasita, ou seja, não ocorre reação cruzada com outros coccídeos (BARRAT *et al.*, 2008).

3.3.2 Toxoplasmose

3.3.2.1 Etiologia

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908), parasito pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.*, 1980). Esse parasito é um coccídeo intracelular obrigatório, que infecta naturalmente o homem, os animais selvagens e

domésticos, e também os pássaros. A enfermidade tem grande importância na saúde pública, estima-se que um terço da população mundial foi exposta à infecção pelo *T. gondii* (TENTER *et al.*, 2000).

3.3.2.2 Ciclo de vida e formas de transmissão

Os hospedeiros definitivos são os felídeos, domésticos e selvagens, pois neles ocorre o ciclo enteroepitelial ou sexual do parasito, com esquizogonia e gametogonia, culminando com a fecundação e produção dos oocistos. Estes são eliminados para o meio juntamente com as fezes, após sofrer esporulação, produzem dois esporocistos, cada qual contendo quatro esporozoítos, tornando-se infectantes e são altamente resistentes (DUBEY *et al.*, 1997; SIBLEY *et al.*, 2003). Podem ser transportados mecanicamente por moscas, baratas, besouros e outros artrópodes, sendo, portanto uma forma de resistência e de disseminação ambiental dessa parasitose (FREYRE, 1989).

O *T. gondii*, no seu ciclo evolutivo apresenta-se sob três formas principais: 1) taquizoítos, de rápida multiplicação e que ocorrem na infecção aguda; 2) bradizoítos, localizados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica ou assintomática, e 3) oocistos, produto final da reprodução sexuada (MILLER *et al.*, 1972). Os felídeos podem se infectar pela ingestão de qualquer uma das três formas evolutivas, sendo a ingestão de cistos com bradizoítos, por meio do carnivorismo, a via mais frequente (SWANGO *et al.*, 1989; DUBEY *et al.*, 1996; DUBEY, 2002).

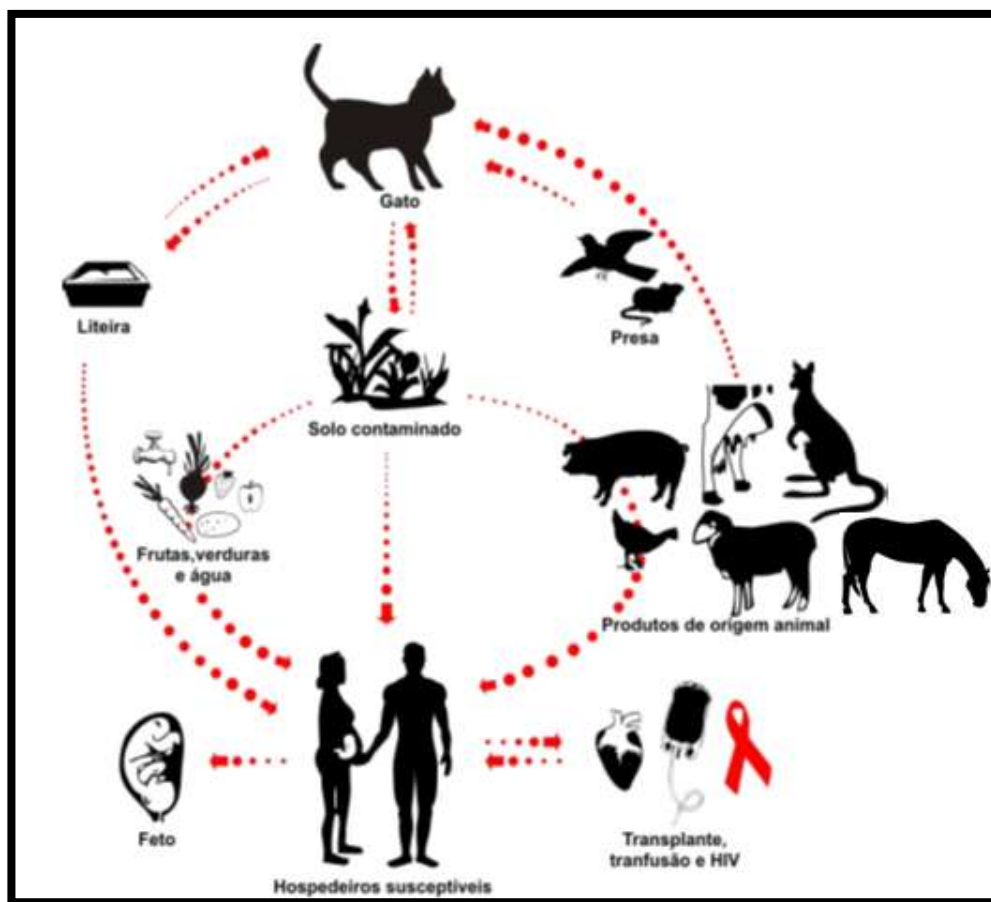


FIGURA 3- CICLO DE VIDA DO *T. gondii*

FONTE: ADAPTADO FERNANDA GRECCO, 2007.

Os equinos são animais herbívoros, e a infecção nesta espécie ocorre, provavelmente ingerindo oocistos presentes em alimentos, em feno e em cama contaminados (SILVA; LANGONI, 2000). Após a ingestão, a parede do oocisto se rompe por ação enzimática, liberando as formas infectantes, esporozoítos, no trato digestivo. Esses esporozoítos penetram nas células epiteliais do intestino parasitado onde, após multiplicação, transformam-se em taquizoítos. A disseminação ocorre pelo rompimento das células infectadas seguido da invasão das células vizinhas, distribuindo-se praticamente por todo organismo via circulação sanguínea ou se difundindo de uma célula a outra, podendo, ainda, ser disseminado por macrófagos, linfócitos ou granulócitos, além de circular na corrente sanguínea na sua forma livre (HUTCHISON *et al.*, 1970; FRENKEL, 1973).

A toxoplasmose congênita constitui-se numa das formas de maior importância da doença tanto em humanos quanto em animais domésticos, e que se manifesta com maior frequência durante os dois primeiros trimestres da gestação. Por outro

lado, quando adquirida no terceiro trimestre, ocorrem infecções subclínicas no feto ou mesmo ausência de infecção (DESMONTS; COUVREUR, 1974). Em ovinos, caprinos, suínos e bovinos, a transmissão congênita de *T. gondii*, pode ocasionar grandes prejuízos econômicos, decorrentes principalmente de abortos, natimortos e crias debilitadas (VITOR; PINTO, 1991; FILHO *et al.*, 2001). Em equinos, a possibilidade da infecção transplacentária e sua atividade patogênica interferindo com a fertilidade foi proposto por Roperto *et al.* em 1983, apesar de não ser comum, é possível essa forma de transmissão na espécie equina (TASSI, 2007). Em 1990, Turner e Savva evidenciaram a presença de *T. gondii* na placenta equina, e em 1992, a infecção transplacentária num feto equino abortado.

Também é relatada a transmissão de taquizoítos aos neonatos pela ingestão de leite (via lactogênica) logo após o nascimento (DUBEY, 1993). Em relação à transmissão venérea, já foi comprovado o isolamento do *T.gondii* no sêmen de caprinos (DUBEY; SHARMA, 1980), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009), suínos (MOURA *et al.*, 2007) e caninos (ARANTES *et al.*, 2009), sugerindo a possibilidade dessa via de transmissão.

3.3.2.3 Patogenia e sinais clínicos

Os taquizoítos disseminam-se pelo sistema vascular e atingem vários órgãos, como o sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, vísceras e olhos. Nestes tecidos, os taquizoítos se multiplicam intracelularmente, e, caso a multiplicação seja intensa, causam lise celular e desencadeiam reação inflamatória local. O desenvolvimento de resposta imune protetora leva ao encistamento do organismo, formando os cistos teciduais que contêm bradizoítos, forma de multiplicação lenta, os quais podem permanecer latentes sem causar doença por vários anos. Dessa forma, encontram-se protegidos da ação do sistema imune e de drogas (DUBEY *et al.*, 1998).

Tem-se observado, de forma geral, uma baixa prevalência da toxoplasmose em equídeos, quando comparada com outras espécies domésticas (STELMANN *et*

al., 2011). As infecções em equinos por *T. gondii* normalmente são subclínicas, o diagnóstico baseia-se em técnicas sorológicas, que permitem detectar a presença de anticorpos específicos contra o parasita (AKCA *et al.*, 2004).

Os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes à infecção pelo parasita e apesar de não ser muito frequente podem apresentar alguns sinais clínicos, caracterizados por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e aborto (TURNER; SAVVA, 1991). Não há evidência definitiva que *T. gondii* cause doença clínica em cavalos (DUBEY, 1999a), entretanto formas bradizoíticas do parasito foram isoladas de tecido muscular de cavalos saudáveis, indicando que o consumo de carne de cavalo inadequadamente preparada poderia constituir uma via de transmissão para a infecção humana, e também para animais de zoológicos, em especial para os felídeos. Esses, quando primoinfectados, podem eliminar oocistos no ambiente, pelas fezes (DUBEY, 1985).

3.3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado através da cultura, sorologia e histologia. Na maioria dos casos o diagnóstico sorológico é o mais utilizado (SAVVA *et al.*, 1995), duas técnicas se destacam, a técnica de aglutinação direta modificada (MAD) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CAMOSSO *et al.*, 2010). Qualquer que seja o método usado se faz importante o emprego de amostras colhidas com intervalo de duas semanas para determinar a soroconversão, indicativo de infecção recente (HILL; DUBEY, 2002). O teste de imunoabsorção enzimática (ELISA), mais moderno, permite a detecção de resposta de IgM compatível com uma infecção ativa recente. Já que a resposta de IgG é geralmente alta e pode persistir por vários dias, indica uma exposição anterior, ou seja indicativo de casos crônicos. Nos casos fatais, a histopatologia revela os taquizoítos e os cistos teciduais nos órgãos afetados (McCANDLISH, 2001; SILVA *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, o diagnóstico molecular tem ajudado a melhorar e acelerar o diagnóstico da toxoplasmose. Diferentes técnicas de PCR podem ser

utilizadas para diagnosticar o *T. gondii*, entre as quais, a *nested* –PCR e a *real-time* PCR, que mostram boa especificidade e sensibilidade (FUENTES *et al.*, 1996; MONTOYA *et al.*, 2009; MONTOYA *et al.*, 2010). O desenvolvimento da *real-time* PCR, minimiza o tempo necessário para detectar o DNA de *T. gondii*, além de realizar a quantificação do parasita e reduzir os problemas de contaminação. (COSTA *et al.*, 2000;. LIN *et al.*, 2000).

3.3.3 Aborto equino a vírus

3.3.3.1 Etiologia

O principal agente etiológico viral é o *Herpesvírus equi-1* (HVE-1) causador da rinopneumonite equina em cavalos jovens (THOMASSIAN, 2005). Os distúrbios reprodutivos levam ao abortamento no terço final da gestação, de 20 a 40% das éguas do plantel, o que acarreta grandes prejuízos econômicos (OSTLUND, 1993). Os herpesvírus equinos são classificados de 1 a 5, são DNA vírus pertencentes à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. Apresentam distribuição mundial e são agentes infecciosos importantes para a espécie equina, causando diferentes formas de doença, sendo o HVE-1 responsável por causar aborto, assim como rinopneumonite, mortalidade perinatal e mieloencefalopatia (ALLEN *et al.*, 1986; SWERCZEK; DENNIS, 2007, LARA *et al.*, 2010), e HVE-4, antigo subtipo 2 do HVE-1, causa rinopneumonite e está associado com surtos esporádicos de aborto (SWERCZEK, DENNIS, 2007).

3.3.3.2 Transmissão

O HVE-1 é altamente contagioso e sua transmissão é horizontal, ou seja, ocorre pela inalação de aerossóis provenientes do trato respiratório de animais infectados, pela ingestão de alimento e água contaminados por secreções nasais ou contato direto com fetos abortados e restos placentários (OSTLUND *et al.*, 1991; ALLEN, 2002a). Carvalho *et al.* (2000) apontam o sêmen de garanhões persistentemente infectados como potencial transmissor do HVE-1 durante a cópula ou inseminação artificial.

3.3.3.3 Patogenia e sinais clínicos

Os dois herpesvírus mais importantes para equinos são o HVE-1 e o HVE-4, sendo a severidade da doença relacionada com a idade e o *status* imunológico do animal infectado (OIE, 2008a). Apesar de ambos os vírus, serem detectados no epitélio do trato respiratório e nos macrófagos pulmonares, somente o HVE-1 demonstrou predileção por células endoteliais vasculares do sistema nervoso central e do trato respiratório, bem como por leucócitos sanguíneos circulantes (PATEL *et al.*, 1982; MORI, 2005). Uma vez infectados pelo HVE-1, assim como qualquer outro herpesvírus, os equinos tornam-se portadores latentes e potenciais fontes de infecção do vírus. A reexposição ao vírus ou a sua reativação por fatores estressantes predisponentes podem provocar novas infecções durante toda a vida do animal (EDINGTON *et al.*, 1985; EDINGTON *et al.*, 1994; SCOTT *et al.*, 1983; MORI, 2005).

Os reservatórios celulares para os vírus latentes HVE-1 e HVE-4 são os neurônios sensitivos dos gânglios trigêmeos e os linfócitos T dos gânglios linfáticos que drenam o trato respiratório superior, como: nódulos linfáticos submandibulares, retrofaríngeos e bronquiolares (SLATER *et al.*, 1994). Nestas células, o genoma viral está presente, sem a produção de partículas virais infecciosas. No entanto, a

latência é um estado reversível, no qual os genomas dos vírus latentes podem reativar-se para recuperar sua plena atividade de transcrição com uma produção consequente de vírus infeccioso (REED; TORIBIO, 2004).

O quadro clínico respiratório, causado pelo HVE-1, aparece sob a forma de surtos e acomete principalmente os animais jovens, caracterizado por febre, atingindo valores de até 41°C, com duração de dois a cinco dias, anorexia e descarga nasal serosa profusa que, posteriormente, torna-se mucopurulenta. Nos animais adultos estes sinais clínicos dificilmente são observados (LARA *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2000).

A patogênese do aborto causado pelo HVE-1 envolve uma série de eventos. O vírus inalado replica-se na mucosa nasofaríngea, na traquéia e nos brônquios e, a partir daí, dissemina-se para o tecido linfático regional, sofrendo uma replicação secundária nos linfonodos, com a liberação de linfócitos infectados para a corrente sanguínea, ocorrendo a viremia (ALLEN, 1998). Uma nova replicação viral acontece nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos do SNC e do útero gravídico (REED; TORIBIO, 2004). Uma infecção generalizada dos vasos sanguíneos endometriais resulta em uma severa vasculite e trombose multifocal, as quais podem resultar em um aborto por lesões no endométrio sem infecção viral do feto. Lesões vasculares menos extensas podem permitir a transferência de vírus ao longo da barreira uteroplacentária e, então, ocorre o aborto devido à infecção do feto pelo vírus. Uma infecção transplacentária próxima ao parto pode resultar no nascimento de um potro vivo infectado, acompanhado usualmente pela morte alguns dias após o nascimento, condição conhecida como doença neonatal do potro (PATEL; HELDENS, 2005). Estas diferenças no potencial abortogênico podem estar relacionadas a diferenças no nível de viremia ou de infecção das células endoteliais que variam conforme a cepa do vírus (REED; TORIBIO, 2004).

Os fetos abortados infectados pelo HVE-1, no final da gestação, são encontrados, normalmente envolvidos pela placenta, sendo a morte causada por asfixia, devido à rápida separação da placenta. O exame macroscópico do feto revela lesões vasculares graves com exsudato seroso ou serosanguinolento nas cavidades serosas, icterícia, esplenomegalia, edema perirenal e edema pulmonar. Na histopatologia podem ser encontradas áreas de necrose no fígado, glândula

adrenal, timo, baço, pulmão e intestino delgado (SMITH *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 2000).

Uma característica do aborto causado pelo HVE-1 é que as éguas não apresentam sinais prévios, e encontram-se clinicamente normais, podendo abortar 14 a 120 dias após a exposição ao vírus (MOREIRA *et al.*, 2000). A expulsão do feto é rápida, assim como a eliminação da placenta (ALLEN, 2002a). O trato genital involui rapidamente como se fosse um parto normal (THOMASSIAN, 2005), não afetando sua fertilidade. As éguas não se tornam imunes a uma posterior infecção, porém abortos sucessivos por herpesvírus são raros. Como o feto e a placenta são as principais fontes de infecção para outras éguas, quanto mais rápido for o diagnóstico e o isolamento da égua que abortou, menores serão as perdas (OSTLUND, 1993; SMITH, 1997).

3.3.3.4 Diagnóstico

Vários métodos rápidos de diagnóstico têm sido desenvolvidos como *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), a reação em cadeia pela polimerase (PCR), coloração com imunoperoxidase, ou sondas de hibridização de ácidos nucleicos, porém essas técnicas são muitas vezes restritas a laboratórios de referência (OIE, 2008a). A imunofluorescência em seções de timo, pulmão, fígado e baço também proporciona um diagnóstico rápido e acurado do aborto por herpesvírus (MOREIRA *et al.*, 2000). O isolamento viral em cultivo celular, a partir de secreções da cavidade nasal, sangue e fragmentos de órgãos fetais, apesar de exigir mais tempo, representa um método de alta acurácia (ALLEN, 2000).

Os métodos sorológicos, como fixação de complemento e soroneutralização, quando utilizados para o diagnóstico de infecções recentes, requerem amostras de soro pareadas da fase aguda, dois a três dias após o aparecimento das manifestações clínicas, e da fase de convalescença, três a quatro semanas após o início da doença. O resultado é considerado positivo quando ocorre a soroconversão, com aumento de pelo menos quatro vezes no título de anticorpos

(ALLEN, 2000; ALLEN, 2002b; MORI, 2005). Amostras de soro de éguas coletadas no momento do aborto geralmente apresentam quantidades máximas de anticorpos, devido ao período de incubação entre a infecção e o aparecimento da doença (MOREIRA *et al.*, 2000).

3.3.3.5 Controle

A vacinação é bastante eficiente no controle da doença, devendo ser realizada com o uso, preferencialmente, de vacinas de alto título com vírus inativado pela formalina e com adjuvantes. As vacinas vivas não são recomendadas devido aos riscos de abortos ou de paralisias. Inicialmente todas as éguas que irão entrar em reprodução devem ser vacinadas, repetindo-se a dose 15 a 30 dias após. E depois, recomenda-se vacinar as éguas no 5º, 7º e 9º mês de gestação (THOMASSIAN, 2005). Teoricamente, todos os potros têm títulos de anticorpos específicos para o HVE-1 e o HVE-4 que podem ser medidos depois da ingestão do colostro da mãe. Com a queda dos anticorpos maternos, que possuem uma meia-vida de 26 dias, os potros tornam-se soronegativos e, por consequência, totalmente suscetíveis à infecção aos 5-6 meses de idade. Portanto, devem-se administrar as vacinas e as subseqüentes revacinações, a fim de proporcionar um nível máximo de proteção imune aos potros, principalmente em momentos estressantes, como os associados ao desmame, transporte, introdução, reagrupação social, vendas, treinamento e competições (REED; TORIBIO, 2004).

3.3.4 Anemia infecciosa equina

3.3.4.1 Etiologia

O vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) é um RNA vírus, envelopado, classificado na família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, juntamente com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência bovina (BIV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), e o lentivírus de pequenos ruminantes (SRLVs).

O VAIE foi o primeiro lentivírus a ser identificado e o primeiro vírus associado com infecção animal. Apresenta duas glicoproteínas codificadas no envelope (gp 90 e gp 45) e quatro proteínas não glicosiladas maiores (p26, p15, p11 e p9) (HIRSH; ZEE, 2003). As glicoproteínas “gp 90” e “gp 45” são, provavelmente, exigidas para a penetração do vírus na célula hospedeira e atuam também como imunoestimulantes (TIMONEY *et al.*, 1988). O VAIE é bastante resistente, sobrevivendo por várias horas quando exposto à luz solar e resistindo à fervura por pelo menos 15 minutos (THOMASSIAN, 2005).

3.3.4.2 Transmissão

A AIE é uma enfermidade cosmopolita, sendo mais frequente em climas quentes e úmidos, devido à sua transmissão por insetos hematófagos, que atuam como vetores (THOMASSIAN, 2005). No Brasil, a região do Pantanal apresenta uma alta prevalência (SILVA *et al.*, 2001). Acomete todos os equinos (ISSEL *et al.*, 1979), sem preferência por raça, sexo e idade. A transmissão também pode ser iatrogênica, através de agulhas, seringas, esporas, freios, arreios ou outros utensílios contaminados com sangue infectado. A transmissão transplacentária pode ocorrer, principalmente se a égua apresentar um quadro febril, este associado com a viremia, e resultar no abortamento ou nascimento de potros infectados, que frequentemente

morrem dentro de dois meses. Outras formas de transmissão são através do colostro e do sêmen (RADOSTITIS *et al.*, 2002).

3.3.4.3 Patogenia e sinais clínicos

Semelhante ao HIV, as células-alvo do VAIE são principalmente os monócitos e os macrófagos (MONTAGNIER, 1985; TASHIJAN; CRUSBERG, 1989). Os monócitos do sangue podem ser infectados, mas a transcrição viral é limitada até a célula se diferenciar em macrófagos teciduais (SELLON *et al.*, 1992; MAURY, 1994). Esse fenômeno é conhecido como "cavalo de Tróia", permitindo disseminar a infecção para outros tecidos, sem o vírus ser detectado pelo sistema imune (HARROLD *et al.*, 2000). Além dos macrófagos, células endoteliais podem ser infectadas (MAURY *et al.*, 1998). Estas células também podem ser persistentemente infectadas servindo como reservatório para o vírus nas fases subclínicas da infecção (HARROLD *et al.*, 2000).

A AIE é caracterizada por três fases distintas: aguda, crônica e assintomática (OAKS *et al.*, 1998; CRAIGO *et al.*, 2006). A doença aguda é observada dentro de 3 a 4 semanas após a infecção, está associada com altos níveis de viremia, e os sinais clínicos da doença incluem febre intermitente, oscilando entre 39 e 41°C, anorexia, fraqueza, edema ventral, trombocitopenia e anemia. Alguns animais podem morrer entre 10 e 30 dias após o início dos sinais clínicos (COOK *et al.*, 1996). A AIE crônica é marcada por episódios recorrentes da doença, caracterizada por períodos de febre de 1 a 7 dias, que pode voltar à normalidade por algumas semanas, para, posteriormente, principalmente sob condições de estresse e de má nutrição, manifestar novamente os sinais. Esse período pode durar de 8 a 12 meses após a infecção. Depois da fase crônica, a maioria dos equinos infectados que sobrevivem, tornam-se portadores assintomáticos, provavelmente devido ao desenvolvimento da imunidade, permanecendo infectados por toda a vida. Eventualmente, sob condições de intenso estresse, o quadro pode voltar à forma aguda e a doença provocar a morte do animal (MONTELARO *et al.*, 1993; HARROLD *et al.*, 2000; THOMASSIAN, 2005).

Cada episódio febril em equinos cronicamente infectados está associado com o surgimento de uma nova variante antigênica do vírus (McGUIRE *et al.*, 1987). Estas novas variantes antigênicas surgem devido à pressão do sistema imune, e dessa forma, tornam-se temporariamente capazes de escapar da resposta imune do hospedeiro, resultando nos episódios febris recrudescentes (SELLON *et al.*, 1994).

Muitos equinos podem se infectar com o VAIE e não apresentar nenhum sinal clínico da doença, sendo portadores inaparentes até num exame de rotina serem detectados anticorpos anti-VAIE (ISSEL; COGGINS, 1979). Assim como qualquer lentivírus, uma vez infectado com o VAIE, o cavalo permanece infectado para o resto da vida (CHARMAN *et al.*, 1976). Embora em portadores inaparentes o nível de viremia encontre-se baixo, quando comparado com o da fase aguda, o animal atua como um reservatório da infecção, podendo transmitir a doença para animais não infectados (SELLON *et al.*, 1994).

A anemia, nos casos agudos e crônicos ativos, pode ser bastante acentuada e o hemograma pode revelar em quadros de maior gravidade 2 a 4 milhões de hemácias/mm³, 12% no hematócrito, e 4 a 5 g/dL de hemoglobina. Na contagem diferencial de leucócitos nos estágios febris frequentemente observa-se leucopenia por neutropenia, com linfocitose relativa (THOMASSIAN, 2005). As causas da anemia são multifatoriais, incluindo destruição imunomediada de eritrócitos, sendo a hemólise resultado da adesão da hemaglutinina viral aos eritrócitos, que são rapidamente fagocitados (sideroleucócitos), associados a ação do sistema complemento e com a presença de anticorpos direcionados contra o VAIE (SENTSUI; KONO, 1987). Além desses fatores, ainda ocorre supressão da medula óssea (SWARDSON *et al.*, 1992; CRAWFORD *et al.*, 1996).

3.3.4.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é de fundamental importância para detecção dos portadores da doença, visto que seu programa oficial de controle determina a eutanásia dos animais infectados (BRASIL, 2004). Desde o início da década de

1970, o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) tem sido usado e é reconhecido como a prova padrão-ouro da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) no diagnóstico da AIE (ALVAREZ *et al.*, 2007). Também conhecido como teste de Coggins, em homenagem ao seu criador, apresenta alta especificidade, detectando anticorpos contra a proteína p26 do core viral que é antigenicamente estável, com domínios altamente conservados entre os isolados do VAIE e imunodominante (BIRKETT *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 2007). Apresenta algumas limitações, dentre elas, a incapacidade de detectar anticorpos para o VAIE nos estágios iniciais da doença sendo que o equino infectado produz resposta humoral detectável em 12 dias pós infecção (d.p.i.), mas se torna positivo para a IDGA entre 15 e 45 d.p.i (ISSEL; COGGINS, 1979).

Testes mais sensíveis e capazes de detectar anticorpos para o VAIE têm sido descritos, baseados na técnica de ELISA, com maior precocidade em relação ao IDGA, e maior sensibilidade, em alguns casos particulares (SHANE *et al.*, 1984; SHEN *et al.*, 1984; LEW *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1997). Melhorias reais são esperadas pela utilização da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), permitindo a detecção de RNA viral no sangue nos estágios iniciais da infecção, assim como, nos estágios subclínicos. A especificidade do teste é geralmente satisfatória quando são usados iniciadores dirigidos a uma região conservada no genoma do VAIE (LANGEMEIER *et al.*, 1996).

Na histopatologia usualmente revela necrose extensa de tecidos linfáticos, degeneração gordurosa hepática, necrose das células de Kupffer, hemossiderose no fígado, baço e linfonodos, vasculite com infiltração de células mononucleares em vários órgãos (WEIBLEN, 2001), hemorragia e edema, atribuídos a alterações vasculares. Glomerulonefrite mediada por complexo imune e necrose hepática centrolobular são comuns em lesões crônicas. Meningite, coroidite não granulomatosa crônica com focos de infiltrados de linfócitos, encefalite subependimais e hidrocefalia estão associadas à ataxia (HIRSH; ZEE, 2003).

3.3.4.5 Controle

Não existe vacina, nem tratamento para AIE. O controle preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a maioria das regiões brasileiras, é o sacrifício dos animais positivos no teste de IDGA ou a interdição da propriedade, no caso de ser detectado foco de AIE (BRASIL, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2011), porém em áreas endêmicas, preconiza-se a segregação de animais positivos e negativos, pois o distanciamento de 200 metros permite estabelecer uma adequada margem de segurança com relação ao risco de transmissão do VAIE por vetores (BARROS; FOIL, 2009). A segregação dos animais negativos para AIE é um método eficaz quando monitorada periodicamente por meio de exames sorológicos (ISSEL *et al.*, 1990).

3.3.5 Arterite viral equina

3.3.5.1 Etiologia

A arterite viral eqüina (AVE) é uma enfermidade infecciosa, causada por um vírus do gênero *Arterivirus*, família *Arteriviridae*, ordem *Nidovirales*. Devido às semelhanças na estrutura e morfologia dos vírions, na sequência de nucleotídeos e organização genômica, três outros vírus são classificados no mesmo gênero e família: vírus elevador da lactato-desidrogenase, vírus da febre hemorrágica dos símios e o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos, sendo este responsável por grandes prejuízos na suinocultura (PLAGEMANN; MOENNIG, 1992). É um RNA vírus, de fita simples de senso positivo, pequeno e envelopado (GLASER *et al.*, 1997). Evidências sorológicas sugerem que a infecção natural ocorra em todos os equídeos. As principais consequências dessa infecção estão relacionadas com o aborto e o estabelecimento do garanhão como carreador inaparente do vírus, disseminando-o pelo sêmen (TIMONEY; MCCOLLUM, 1993).

A sobrevivência do vírus é dependente da temperatura, embora possa sobreviver apenas 20-30 minutos a 56°C e por 2 ou 3 dias a 37°C, pode resistir por mais de 75 dias a 4°C (HOLYOAK *et al.*, 2008). O vírus pode ser estocado a -70°C por anos, sem perder sua infectividade, porém, é rapidamente inativado por solventes lipídicos, como éter e clorofórmio, por desinfetantes comuns e detergentes (SHIRAI *et al.*, 2000). O vírus permanece viável em sêmen fresco, resfriado e congelado (TIMONEY *et al.*, 1987).

3.3.5.2 Transmissão

A transmissão da AVE ocorre principalmente pela via respiratória e/ou venérea. Garanhões naturalmente infectados podem tornar-se carreadores inaparentes do vírus, sendo os principais responsáveis pela disseminação da doença, atuando como reservatórios naturais do vírus (TIMONEY; McCOLLUM, 1993; HOLYOAK *et al.*, 2008; BROADDUS *et al.*, 2011). O vírus também se encontra presente em outras secreções corporais, como urina, fezes, secreção lacrimal e vaginal (TIMONEY; McCOLLUM, 1993). O vírus pode ser excretado pela urina por longos períodos, contribuindo para disseminação da doença. A transmissão pode ocorrer também por via oral, através de água e alimentos contaminados por secreções e excreções dos enfermos (THOMASSIAN, 2005), e também pelo embrião de éguas doadoras inseminadas com sêmen infectado pelo VAVE (BROADDUS *et al.*, 2011). Até o momento, não há relatos da transmissão via venérea de fêmeas para machos, apesar deste quadro ainda não estar bem esclarecido (DE VRIES *et al.*, 1996).

3.3.5.3 Patogenia e sinais clínicos

Após a inalação dos aerossóis, o vírus replica-se inicialmente nos macrófagos pulmonares, espalhando-se, rapidamente por todo o corpo, e infectando outros tipos de células, incluindo as células endoteliais do sistema circulatório, células musculares lisas das artérias, o miométrio, o epitélio tubular renal, bem como o epitélio da adrenal e, raramente, parênquima hepático, células da cripta intestinal, e do epitélio brônquico (CRAWFORD *et al.*, 1973; LOPEZ *et al.*, 1996).

As consequências da infecção pela AVE podem se manifestar desde uma infecção subclínica, somente reconhecida pela soroconversão, ou apresentar manifestações clínicas características, dependendo da idade e das condições físicas do animal infectado, das condições ambientais e da cepa do vírus (GLASER *et al.*, 1997). Os sinais clínicos mais observados são febre de até 41°C, apatia, anorexia, depressão, leucopenia, edema da porção distal dos membros, principalmente dos posteriores, secreção ocular e nasal, conjuntivite, rinite, edema da região periorbital ou supraorbital, edema do escroto e do prepúcio dos garanhões e da glândula mamária das éguas, e abortamento em éguas no terço final da gestação. Em animais gravemente enfermos a dispnéia é intensa como resultado do edema e congestão do pulmão. Os sinais clínicos aparecem 2 a 14 dias após a exposição aos aerossóis e persistem por 2 a 9 dias. No caso da transmissão venérea, o período de incubação é de 6 a 8 dias (TIMONEY; MCCOLLUM, 1993; HOLYOAK *et al.*, 2008).

Durante a fase aguda da infecção, os garanhões podem apresentar um período de subfertilidade temporário, associado com redução da libido, diminuição da motilidade espermática, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais. Essa diminuição da qualidade seminal é consequência do aumento da temperatura corporal e do edema escrotal, não sendo um efeito direto causado pelo vírus no epitélio germinal do testículo (NEU *et al.*, 1992). Na fase crônica, que pode persistir por anos após a infecção, a qualidade seminal é normal e a manutenção do vírus ocorre no canal deferente, ampolas, vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais (NEU *et al.*, 1988). A manutenção do vírus é dependente da presença de testosterona, acredita-se que seja pela sua ação imunossupressora (MCCOLLUM *et al.*, 1994). Garanhões

persistentemente infectados que foram castrados e que receberam testosterona continuaram eliminando o vírus, e aqueles que receberam placebo, não o eliminaram mais (LITTLE *et al.*, 1992).

Os abortos frequentemente ocorrem durante a fase aguda tardia ou no começo da fase de convalescência, com ocorrência ou não de sintomatologia. Os fetos muitas vezes apresentam-se parcialmente autolisados, indicando terem ido a óbito dois a quatro dias antes do abortamento. Segundo Coignoul e Cheville (1984), o aborto seria resultado do severo quadro de miometrite, causado pela replicação viral, e não resultado de uma infecção fetal. Em decorrência do edema do miométrio, ocorre um decréscimo do aporte sanguíneo e redução da produção de progesterona pelo útero. Não é comum os fetos apresentarem lesões, mas quando presentes incluem congestão e edema de tecidos e linfonodos, hemorragia epicárdica, petéquias hemorrágicas na superfície da pleura e peritônio, e pequenas quantidades de líquido dentro da cavidade pleural. Lesões histopatológicas são raramente observadas, o vírus pode ser isolado da placenta, dos líquidos e tecidos fetais, constituindo uma perigosa fonte de infecção (TIMONEY; McCOLLUM, 1996; GLASER *et al.*, 1997).

Equinos infectados desenvolvem anticorpos específicos que podem ser detectados no sangue por vários anos. Éguas naturalmente eliminam o vírus depois da fase aguda da doença e desenvolvem uma forte imunidade contra uma reinfecção. Potros, entre 2 e 6 meses, de éguas soropositivas, são resistentes a infecção viral, como resultado dos anticorpos ingeridos através do colostro, depois tornam-se soronegativos (HULLINGER *et al.*, 1998). A transmissão transplacentária pode ocorrer quando a égua se infecta num período mais tardio da gestação podendo resultar em potro congenitamente infectado ou aborto (VAALA *et al.*, 1992; WADA *et al.*, 1996). Garanhões também desenvolvem anticorpos específicos, porém 30 a 60% tornam-se persistentemente infectados, sendo sempre soropositivos (NEU *et al.*, 1988; GLASER *et al.*, 1995).

3.3.5.4 Diagnóstico

Clinicamente a AVE assemelha-se com outras infecções virais de equinos, tais como aquelas causadas pelos herpes vírus equinos tipos 1 e 4, vírus da influenza equina, e vírus da anemia infecciosa equina, de modo que um diagnóstico definitivo requer confirmação laboratório (GLASER *et al.*, 1997). O diagnóstico laboratorial da AVE pode ser realizado através do isolamento viral em cultura de células RK-13 (células de rim de coelho com cinco semanas de vida), amplificação de ácidos nucleicos através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), detecção de antígeno viral pelo ELISA, e detecção de anticorpos específicos através de análises sorológicas, como soroneutralização, fixação de complemento, imunofluorescência indireta, imunodifusão e ELISA (TIMONEY; MCCOLLUM, 1993; GLASER *et al.*, 1997; OIE, 2008b).

A infecção aguda pode ser diagnosticada através do isolamento viral ou da demonstração da soroconversão, em amostras de soro sanguíneo colhidas durante a fase aguda da doença, e com um intervalo de 21 a 28 dias após, fase convalescente. O aumento do título de anticorpos superior a quatro vezes é indicativo de exposição ao vírus. A técnica de soroneutralização é o teste mais usado e mais sensível para detecção de anticorpos contra o VAVE, o ELISA também tem sido bastante descrito, porém apresenta o inconveniente de apresentar um percentual elevado de reações falso-positivas (GLASER *et al.*, 1997; OIE, 2008b).

As amostras mais adequadas para isolamento viral de equinos vivos incluem swabs da região nasofaringeana, da conjuntiva, ou a partir de amostras de sangue colhidas com EDTA, para separação da camada leucoplaquetária. O isolamento viral em amostras de sêmen, de garanhões soropositivos, a partir da fração rica em espermatozoides, é importante no controle da doença. Quando não é possível realizar o isolamento viral, nem as técnicas de PCR, a partir do sêmen, o garanhão pode ser usado para cobrir duas éguas soronegativas, que depois de 28 dias devem ser avaliadas, se apresentarem soroconversão, é um indicativo de que o sêmen estava infectado (TIMONEY; MCCOLLUM, 1993; OIE, 2008b). Nos casos de aborto, a placenta, líquidos fetais, pulmão, baço e linfonodos devem ser coletados para

isolamento viral, e a soroconversão da égua deve ser observada (GLASER *et al.*, 1997).

3.3.5.5 Controle e prevenção

As estratégias de controle e prevenção num surto de AVE que deveriam ser realizadas são isolar todos os novos animais que chegarem à propriedade por 3 a 4 semanas, se possível, separar as éguas prenhes em lotes, de acordo com a previsão do parto e determinar o *status* de infectividade do sêmen utilizado para IA (HOLYOALK *et al.*, 2008).

Os requisitos zoosanitários determinados pelo MAPA para a importação de equinos determinam que os animais sejam mantidos em quarentena sob supervisão veterinária em local aprovado pelo serviço veterinário oficial do país exportador. Nesta ocasião devem ser submetidos a testes de diversas doenças dentre elas a arterite viral equina, onde se devem realizar dois testes de soroneutralização, realizados a partir de amostras sanguíneas tomadas com intervalo mínimo de 14 dias. Os machos sorologicamente positivos poderão ser submetidos à prova de isolamento viral, em uma amostra de sêmen coletada durante o período de quarentena. No caso de fêmeas ou machos castrados, um período de isolamento mínimo de 28 dias substitui o teste para esta doença (REQUISITOS, 2003). Salientando-se que no Brasil, até o momento, não existe regulamentação oficial sobre a comercialização e uso das vacinas disponíveis no mercado internacional.

REFERÊNCIAS

- ACLAND, H.M. Abortion in mares. In: McKINNON A.O.& VOSS J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 554-562, 1993.
- AKCA, A.; BABUR,C.; ARSLAN, M.O.; GICIK, Y.; KARA, M.; KILIC, S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. **Veterinary Medicine**, v.49, n.1, p.9-13, 2004.
- ALLEN, G.P. A portrait of the pathogenesis of equine herpesvirus abortion. **Equine Disease Quarterly**, v.7, n.1, p.3-4, 1998.
- ALLEN, G.P. Equine rhinopneumonitis. In: TRUSZCZYNSKI, M.; PEARSON, J.E.; EDWARDS, S.; SCHMITT, B. **Office International des Epizooties: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**, 4 ed., p.565-575, Paris: O.I.E. Press, 2000.
- ALLEN, G.P. Epidemic disease caused equine herpesvirus-1:recommendations for prevention and control. **Equine Veterinary Education**, v.14, p.136-142, 2002a.
- ALLEN, G.P. Respiratory infections by equine herpesvirus types 1 and 4. In: LEKEUX, P. **Equine respiratory diseases**. New York: International Veterinary Information Service (IVIS), 2002b.
- ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infectious. In: PANDEY, R. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology: Veterinary Microbiology**. Basel: D. Karger, p.78-144, 1986.
- ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABLÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.107, p. 287-294, 2002.
- ALTSHULER, G. Placental infection and inflammation. In: **Pathology of the Placenta**, ed. Perrin EVDK, p.141-163, 1984.

ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; VISSANI, A.; RODRIGUEZ, S.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 344-351, 2007.

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.417-431, 2000.

ANTONELLO, A.M.; PIVOTO, F.L.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; SANGIONI, L.A.; POMPERMAYER, E.; VOGEL, F.S.F. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v.187, p.367-370, 2012.

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.S.P.; PINTO, V.M.R.; SAKAMOTO, C.A.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, v.123, p.190-194, 2009.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; DUBEY, J.P.; ANDERSON, M.L. *Neospora* like encephalomyelitis in a calf: Pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.39-46, 1991.

BARRATT, J.; QASSAB, A. S.; REICHEL, P. M.; ELLIS, T. J. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 228-233, 2008.

BARROS, A. T. M. de; FOIL, L. D. Influência da distância na transferência de Tabanídeos (mutucas) entre equinos. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, p.14, 2009.

BASZLER, T.V.; KNOWLES, D.P.; DUBEY, J.P.; GAY, J.M.; MATHISON, B.A.; MCELWAIN, T.F. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.6, p.1423-1428, 1996.

BIRKETT, A.J.; YÉAMOS, B.; CRESPO, I. R.; GAVILANES, F.; PETERSON, D. L. Cloning expression purification, and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1339, p. 62-72, 1997.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of equine reproduction**. 2 ed. Saint Louis: Mosby, 2003.

BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum* – associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n.1-2, p. 1-15. 2001.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 45, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina - A.I.E. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 7 jun. 2004 , Seção 1 , p. 7, 2004.

BROADDUS, C.C.; BALASURIYA, U.B.; TIMONEY, P.J.; WHITE, J.L.; MAKLOSKI, C.; TORRISI, K.; PAYTON, M.; HOLYOAK, G.R. Infection of embryos following insemination of donor mares with equine arteritis virus infective semen. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.47-60, 2011.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; ADURIZ, G.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; DEL-POZO, I.; ATXAERANDIO, R.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Veterinary Parasitology**, v.124, n.1-2, p.19-24, 2004.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-1336, 2004.

CAMOSSI, L.G.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equinos na região de Botucatu-SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.484-488, 2010.

CARVALHO, R.; PASSOS, L.M.F.; OLIVEIRA, A.M.; HENRY, M.; MARTINS, A.S. Detection of equine herpesvirus 1 DNA in a single embryo and in horse sêmen by polymerase chain reaction. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.4, p.302-306, 2000.

CHARMAN, H.P.; BLANDEN, S.; GILDEN, R.V.; COGGINS, L. Equine infectious anemia virus: evidence favoring classification as a retravirus. **Journal of Virology**, v.19, n.2, p.1073-1079, 1976.

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIO-KINNUNAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.; ROLSMA, M.D.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1537-1543, 1999.

CNA. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil (Coletânea Estudos Gleba; 40) / Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – Brasília: CNA; MAPA, 2006.

COGGINS, L.; NORCROSS, N.L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Veterinary**, v.60, n.2, p.330–335, 1970.

COIGNOUL, F.L.; CHEVILLE, N.F. Pathology of the maternal genital tract, placenta and foetus in equine viral arteritis. **Veterinary Pathology**, v.21, p.333-340, 1984.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia. In: Studdert, M.J. **Virus Infections of Equines**. Amsterdam: Elsevier, p.297–323, 1996.

COSTA, J.M.; PAUTAS, C.; ERNAULT, P.; FOULET, F.; CORDONNIER, C.; BREATAGNE, S. Realtime PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 2929–2932, 2000.

CRAIGO, J.K.; STURGEON, T.J.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; LEROUX, C.; MONTELARO, R.C. Apparent elimination of EIAV ancestral species in a long-term inapparent carrier. **Virology**, v.344, p.340-353, 2006.

CRAWFORD, T.B.; HENSON, J.B. Immunofluorescent, light-microscopic and immunologic studies of equine viral arteritis. In: BRYANS, J.T.; GERBER, H., **Proceedings of the 3rd International Conference on Equine Infectious Diseases**, Paris, 1972. Basel: Karger, p.282-302, 1973.

CRAWFORD, T.B.; WARDROP, K.J.; TORNQUIST, S.J.; REILICH, E.; MEYERS, K.M.; McGUIRE, T.C. A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. **Journal of Virology**, v.70, n.11, p.7842-7850, 1996.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J., Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. Bull. **New York Academy of Medicine**, v.50, n.2, p.146, 1974.

DONAHUE, J.M.; SMITH, B.J.; POONACHA, K.B.; DONAHUE, J.K., RIGSBY, C.L. Prevalence and serovars of *Leptospira* involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991–1993 foaling seasons. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.87–91, 1995.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 5, p.794–795, 1980.

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

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEECER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.10, p.1269-1285, 1988.

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

DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. 1 - 158. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**, v. 6, n.2, p.1-158, 1993.

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

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O.C.H.; BLIXT, J.A. Oocyst induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.83, n. 5, p. 870 – 882, 1997.

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

DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **Journal of Parasitology**, v.82, n.6, p.957-961, 1999a.

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

DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P.; ROMAND, S.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; GAMBLE, H.R. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. **Veterinary Parasitology**, v.86, n.4, p.235-238, 1999.

DUBEY, J. P.; MATTIX, M. E.; LIPSCOMB, T.P. Lesions of neonatally induced animals to humans. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1217-1258, 2000.

DUBEY, J.P., LIDDEL, S., MATTSON, D., SPEER, C.A., HOWE, D.K., JENKINS, M.C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **The Journal of Parasitology**, v.87, n.2, p.345-353, 2001.

DUBEY, J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p, 713-717, 2002.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, 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.; MATTISSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPERR, 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 coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.8, p.929-946, 2002.

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

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

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.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90-108, 2011.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; RAJEDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011.

EDINGTON, N.; BRIDGES, C.G.; HUCKLE, A. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. **Equine Veterinary Journal**, v.17, n.5, p.369-372, 1985.

EDINGTON, N.; WELCH, H.M.; GRIFFITHS, L. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n.2, p.140-142, 1994.

FAO – Agriculture data- **FAOSTAT**, 2010. Acessado, 2 de junho de 2012. Disponível na internet: <http://www.faostat3.fao.org>

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p. 1504-1518, 2005.

FILHO, J.R.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MYASAKA, D.; CASTAGNOLLI, K.; COSTA, A.J. Toxoplasmose experimental em coelhas gestantes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.1, p. 3-10, 2001.

FINNO, C.J.; ALEMAN, M.; PUSTERLA, N. Equine protozoal myeloencephalitis associated with neosporosis in 3 horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1405–1408, 2007.

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

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. **The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera**. Baltimore: University Park Press, p. 343-410, 1973.

FREYRE, A. Toxoplasmosis em las especies domesticas y como zoonosis. Montevideo. **Departamento de Publicaciones de La Universidad de la Republica do Uruguai**, p.332, 1989.

FUENTES, I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; DEL CASTILLO, F.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal Clinical of Microbiology**, v.34, p.2368–2371, 1996.

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infections in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v.134, p.1931-1939, 2007.

GILES, R.; DONAHUE, J.; HONG, C.; TUTTLE, P.; PETRITES-MURPHY, M.; POONACHA, K.; ROBERTS, A.; TRAMONTIN, R.; SMITH, B.; SWERCZEK, T. Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3.527 cases (1986-1991). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 203, p. 1170-1175, 1993.

GLASER, A.L.; DE VRIES, A.A.F.; DUBOVI, E.J. Comparison of equine arteritis virus isolates using neutralizing monoclonal antibodies and identification of sequence changes in GL associated with neutralization resistance. **Journal of General Virology**, v.76, p.2223-2233, 1995.

GLASER, A.L.; CHIRNSIDE, E.D.; HORZINEK, M.C.; DE VRIES, A.A. Equine arteritis virus. **Theriogenology**, v.47, n.6, p.1275-1295, 1997.

GONDIM, L.F.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, 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, 2004.

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

GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.; GONDIM, L.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.121–124, 2010.

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

HARROLD, S.M.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. **Journal of Virology**, v.74, n.7, p.3112-3121, 2000.

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in parasitology**, v.43, p.47-104, 1999a.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1175-1188, 1999b.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 8, p. 634-640, 2002.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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.

HOFFMANN, D.C.S. Cinética, avaliação da transmissão vertical e monitoramento da transferência passiva de anticorpos anti-*Neospora* sp. em equinos. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

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

HOLYOAK, G.R.; BALASURIYA, U.B.R.; BROADDUS, C.C.;TIMONEY, P.J. Equine viral arteritis: current status and prevention. **Theriogenology**, v.70, p.403–414, 2008.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v. 35, p. 283-290, 2004.

HULLINGER, P.J.; WILSON, W.D.;ROSSITTO, P.V. et al. Passive transfer, rate of decay, and protein specificity of antibodies against equine arteritis virus in horses from a standardbred herd with high seroprevalence. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.213, p.839–842, 1998.

HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; SIIM, J.C.; WORK, K. Coccidian - like nature of *Toxoplasma gondii*. **British Medical Journal**, v.1, n. 5689, p.142-144, 1970.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/comentarios.pdf>> Acesso em: 14/06/2012.

ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.174, p.727–733, 1979.

ISSEL, C.J.; MCMANUS, J.M.; HAGIUS, S.D.; FOIL, L.D.; ADAMS,W.V. J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia: prospects for control. **Developments in Biological Standartization**, v.72, p.49-57, 1990.

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

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**, 11 ed., São Paulo: Atheneu, p.494, 2005.

KILBAS, Z.G.; ADANIR, R.; AVCIOGLU, H. Seroprevalence of *Neospora caninum* in race horses in Ankara Turkey. **Acta Parasitologica**, v.53, p. 315–316, 2008.

KINDAHL, H.; BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1467–1472, 1998.

KING, J.S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D.J.; AL-QASSAB, S.E.; ELLIS, J.T.; WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

KLIGLER, E.B.; SHKAP, V.; BANETH, G.; MILDENBERG, Z.; STEINMAN, A. Seroprevalence of *Neospora* spp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.109-113, 2007.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. **Archives of Virology**, v.41, p.1-10, 1973.

LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.6, p.1481-1487, 1996.

LARA, M.C.C.S.H.; CUNHA, E.M.S.; NASSAR, A.F.C.; GREGORY, L.; BIRGEL, E.H.; FERNANDES, W.R. Ocorrência do herpes vírus equino 1 (HVE-1) em cavalos criados no Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v.19, n.3, p.254-259, 2003.

LARA, M.C.C.S.H.; TORELLI, C.S.; CUNHA, E.M.S.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, M.S.; BELLO, A.C.P.P.; CUNHA, A.P.; REIS, J.K.P.; LEITE, R.C.; MORI, E. Inquérito sorológico da infecção por herpesvírus equino no Estado de Minas Gerais. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 352-356, 2010.

LAUGIER, C.; FOUCHER, N.; SEVIN, C.; LEON, A.; TAPPREST, J. A 24-year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 116-123, 2011.

LEON, A.; RICHARD, E.; FORTIER, C.; LAUGIER, C.; FORTIER, G.; PRONOST, S. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. **Preventive Veterinary Medicine**, v.104, n.1-2, p.179-183, 2011.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINPELD, E.G.; PAGE, F.C; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LEW, A.M.; THOMAS, L.M.; HUNTINGTON, P.J. A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus. **Veterinary Microbiology**, v.34, p.1-5, 1993.

LIN, M.H.; CHEN, T.C.; KUO, T.T.; TSENG, C.C.; TSENG, C.P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal Clinical of Microbiology**, v.38, p.4121–4125, 2000.

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

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

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.21, n.4, p.317-321, 1999b.

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

LITTLE, T.V.; HOLYOAK, G.R.; McCOLLUM, W.H.; TIMONEY, P.J. Output of equine arteritis virus from persistently infected stallions is testosterone-dependent. In: PLOWRIGHT, W.; ROSSDALE, P.D.; WADE, J.F. **Proceedings of the 6th International Conference on Equine Infectious Diseases**, Cambridge, 1991. Newmarket, R&W Publications, p.225-229, 1992.

LOCATELLI-DITTRICH R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil. **Tese** (Doutorado em Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D.C.S.; SOCCOL, V.T. 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, 2006a.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMAN, D.C.S.; DITTRICH, J.R. Neosporose equina – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.3, p.1-10, 2006b.

LU, K.G.; MORRESEY, P.R. Reproductive tract infections in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 519-552, 2006.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M.L.; LADEIRA, S.R.L.; SOARES, M.P.; ASSIS-BRASIL, N.D.; SCHILD, A.L. Abortos em equinos na região sul do Rio Grande do Sul: estudo de 72 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.22-26, 2012.

MARENZONI, M.L.; LEPRI, E.; CASAGRANDE PROIETTI, P.; BIETTA, A.; COLETTI, M.; TIMONEY, P.J.; PASSAMONTI, F. Causes of equine abortion, stillbirth and neonatal death in central Italy. **The Veterinary Record**, v.170, n.10, p.262, 2012.

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

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

MASUDA, T.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; OMATA, Y. Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Veterinary Parasitology**, v.149, n.1-2, 2007.

MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.68, p.6270–6279, 1994.

MAURY, W.; OAKS, J.L.; BRADLEY, S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v. 72, p.9291–9297, 1998.

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 of Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

McCANDLISH, I. A. P. Infecções específicas caninas. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p. 946-947, 2001.

McCOLLUM, W.H.; LITTLE, T.V.;TIMONEY, P.J. et al. Resistance of castrated male horses to attempted establishment of the carrier state with equine arteritis virus. **Journal Comparative Pathology**, v.111, p.383–388, 1994.

McDOLE M.G.; GAY J.M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.3, p.257-260, 2002.

McGUIRE, T.C.; O'ROURKE, K.; CHEEVERS, W.P. A review of antigenic variation by the equine infectious anemia virus. **Contributions to Microbiology and Immunology**, v.8, p.77-89, 1987.

McKINNON, A.O.; PYCOCK, J.F. Maintenance of pregnancy. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**, 1 ed. USA, cap.57, p.389-409,2007.

McSPORAN, K.D.; CURRALL, J.H.; DEMSTEEQT, A. Toxoplasmosis in goats. **New Zealand Veterinary Journal**, v.33, p.39-40, 1985.

MENDONÇA, A.O.; CERQUEIRA, E.J.L.; ARAUJO, W.N.; MORAES-SILVA, E.; SHIMABUKURO, F.H.; SARKIS, D.T.; SHERLOCK, I.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do Estado da Bahia, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.115-118, 2001.

MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology**, v.58, p. 928-937, 1972.

MONTAGNIER, L. Lymphadenopathy-associated virus: from molecular biology to pathogenicity. **Annals of Internal Medicine**, v.103, p.689–693, 1985.

MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. In: LEVY, J.A. **The Retroviridae**. Plenum Press, p.257–360, 1993.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMÍREZ, C.; FUENTES, I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v.160, p.159–162, 2009.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; BLANCO, M.A.; FUENTES, I. Comparison of nested PCR and real-time PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally infected cats. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.212-213, 2010.

MOREIRA, N.; KRUGER, E.R.; WARTH, J.F.G; BIESDORF, S.M.; GOULARTE, M.M.M; WEISS, R.R. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto equino. **Archives of Veterinary Science**, v.3, n.1, p. 25-30, 1998.

MOREIRA, N.; WEISS, R.R.; KRUGER, E.R. Frequência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus equino tipo 1. **Scientia Agraria**, v.1, n. 1-2, p. 9-14, 2000.

MORI, E. Infecção experimental em cavalos pelo herpesvírus equino tipo 1: aspectos clínicos e detecção do agente pela reação em cadeia pela polimerase. **Tese** (Doutorado em Clínica Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-18102006-123602/pt-br.php> Acesso em: 04/10/12.

MORRIS, S.; KELLEMAN, A.A.; STAWICKI, R.J.; HANSEN, P.J.; SHEERIN, P.C.; SHEERIN, B.R.; PACCAMONTI, D.L.; LEBLANC, M.M. Transrectal ultrasonography and plasma progesterone profiles identifies feto-placental compromise in mares with experimentally induced placentitis. **Theriogenology**, v.67, p.681–691, 2007.

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, n.3, p.633-636, 2007.

MOURA, A.B.; COSTA, A.J.; FILHO, J.S.; PAIM, B.B.; PINTO, F.R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.430–434, 2007.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v.100, p. 633-636, 2007.

NEU, S.M.; TIMONEY, P.J.; LOWRY, S.R. Changes in semen quality following experimental equine arteritis virus infection in the stallion. **Theriogenology**, v.37,p.407–431, 1992.

NEU, S.M.; TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Persistent infection of the reproductive tract in stallions experimentally infected with equine arteritis virus. In: POWELL, D.G. **Proceedings of the 5th International Conference on Equine Infectious Diseases**. Lexington, 1987. Lexington: University Press of Kentucky, p. 149–154, 1988.

OAKS, J.L.; McGUIRE, T.C.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **Journal of Virology**, v.72, p.7263–7269, 1998.

OIE Terrestrial Manual, Equine rhinopneumonitis, Chapter 2.5.9, 2008a. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2009. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf> Acesso em: 10/09/12.

OIE Terrestrial Manual, Equine viral arteritis, Chapter 2.5.10., p.904-918, 2008b. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2009. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.05.10_EVA.pdf> Acesso em: 20/09/12.

OLIVEIRA, A. L. C.; MONTEZUMA, E.S.; RAVAGLIA, E.; JULIANO, R.S.; NOGUEIRA, M. F. Avaliação da prevenção e controle da anemia infecciosa equina no Pantanal. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, p.1-5, 2011. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 98). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT98.pdf>>. Acesso em: 08/09/12.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.301-308, 2003.

OSTLUND E.N.; POWELL D.; BRYANS G.T. Equine herpesvirus-1: a review. **Proceedings of the thirty-sixth annual convention of the American Association of Equine Practitioners**, Lexington, p.387-395, 1991.

OSTLUND, E.N. The equine herpesviruses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.9, n.2, p.283-294, 1993.

OUSEY, J.C.; HOUGHTON, E.; GRAINGER, L.; ROSSDALE, P.D.; FOWDEN, A.L. Progestagen profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. **Theriogenology**, v.63, p.1844–1856, 2005.

PARKINSON, T.; BARRET, D. Veterinary control of herd fertility. In: NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**, v.9, p. 517-558, 2009.

PATEL, J.R.; EDINGTON, N.; MUMFORD, J.A. Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals. **Archives of Virology**, v. 74, n.1, p.41-51, 1982.

PATEL, J.R.; HELDENS, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. **Veterinary Journal**, v.170, n.1, p.14-23, 2005.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.111, n(2-3), p.143-152, 2003.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dog and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001.

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

PITEL, P. H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD, K.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT-LAUGIER, C.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLET, J. J. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.1-6, 2003a.

PITEL, P. H.; LINDSAY, D.S.; CAURE, S.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; GARGALA, G.; MITCHELL, S.M.; HARY, C.; THULLIEZ, P.; FORTIER, G.; BALLET, J.J. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.1–7, 2003b.

PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG V. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: A new group of positive-strand RNA viruses. **Advances and Virus Research**, v.41, p. 99-192, 1992.

PRONOST, S., PITEL, P.H., ROMAND, S., THULLIEZ, P., COLLOBERT, C., FORTIER, G. *Neospora caninum*: first case in France in an aborted equine fetus. Analysis and perspectives. **Pratique Vétérinaire Equine**, v. 31, p.111–114, 1999.

PUSTERLA, N.; CONRAD, P.; PACKHAM, A.; MAPES, S.; FINNO, C.; GARDNER, I.; BARR, B.; FERRARO, G.; WILSON, W. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 281-285, 2011.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., 2002.

REED, S.T.; TORIBIO, R.E. Equine herpesvirus 1 and 4. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.20, n.3, p.631-642, 2004.

REIS, J.K.P.; MELO, L.M.; REZENDE, M.R. et al. Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. **Tropical Animal Health and Production**, v.26, p.65-68, 1994.

REY, L. **Parasitologia**, 3ª ed. RJ, Guanabara Koogan, p.856, 2001.

RENAUDIN, C.D.; TROEDSSON, M.H.; GILLIS, C.L.; KING, V.L.; BODENA, A. Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. **Theriogenology**, v.47, n.2, p.559-573, 1997.

REQUISITOS Zoonos sanitários do Brasil para Importação permanente de equinos de terceiros países. In: TREINAMENTO DE MÉDICOS VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM EQUÍDEOS. **Apostila**, Belo Horizonte: EV – UFMG, p.9-14, 2003.

ROPERTO, F.; PANDOLFI, F.; PAPPARELLA, S.; TRONCONE, A. Presence of a Toxoplasma-like protozoan in an equine fetus. **Acta Medica Veterinaria**, v.3/4, p. 367-371, 1983.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; SANGIONI, L.A.; BOTTON, S.A.; CARGNELUTTI, J.F.; CADORE, G.C.; CEZAR, A.S.; WEIBLEN, R.; LOPES, S.T.A.; VOGEL, F.S.F. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpesvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p.321-323, 2011.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v.102, n.1-2, p.1-15, 2001.

SAVVA, E.; TURNER, C.B.; QUILEZ, J.; VEJA, J.L.; SANCHEZ-ACEDO, C.; ARRUGA, M.V. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in horses and sheep using the polymerase chain reaction. **Research and Reviews in Parasitology**, v.55, n.3, p.177-179, 1995.

SCARPELLI, L.C.; LOPES, W.D.Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p.59–64, 2009.

SCOTT, J.C.; DUTTA, S.K.; MYRUP, A.C. *In vivo* harboring of equine herpesvirus-1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.7, p.1344-1348, 1983.

SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus Research**, v.32, p.111-138, 1994.

SELLON, D.C.; PERRY, S.T.; COGGINS, L.; FULLER, F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates *in vivo* predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. **Journal of Virology**, v.66, p.5906–5913, 1992.

SENTSUI, H.; KONO, Y. Complement-mediated hemolysis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus. **Archives of Virology**, v.95, p.53–66, 1987.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v.135, n.3-4, p.197-203, 2006.

SHANE, B.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.351-355, 1984.

SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; MC GUIRE, T.C. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia antibody to purified p26 viral. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.8, p.1542-1543, 1984.

SHIRAI, J.; KANNO, T.; TSUCHIYA, Y.; MITSUBAYAHSI, S.; SEKI, R. Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, p.85-92, 2000.

SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. **Traffic**, v.4, n.9, p. 581 – 583, 2003.

SILVA, A.V & LANGONI, H. Alimentos de origem animal e toxoplasmose humana. **Higiene Alimentar**, v.14, p.34-39, 2000.

SILVA, R. A. M. S.; ABREU, U. G. P.; BARROS, A. T. M. Anemia Infecciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, p.30, 2001.

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. p. 29-33, 2005.

SILVA, F.W.S.; ALVES, N.D.; AMÓRA, S.S.A.; TEIXEIRA, F.H.V.; ACCIOLOY, M.P.; CARVALHO, C.G.; NÓBREGA, R.M.; FILGUEIRA, K.D.; FEIJÓ, F.M.C. Toxoplasmose: uma revisão. **Ciência Animal**, v.16, n.2, p.71-77, 2006.

SLATER, J.D.; BORCHERS, K.; FIELD, H.J. Equine herpesvirus-1: a neurotropic alphaherpesvirus. **Veterinary Record**, v.135, n.10, p.239-240, 1994.

SMITH, K.C. Review herpesviral abortion in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v.153, p.253-268, 1997.

SMITH, K.C.; BLUNDEN, A.S.; WHITWELL, K.E.; DUNN, K.A.; WALES, A.D. A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.5, p. 496-501, 2003.

STELMANN, U.J.P.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M. Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em equinos com histórico de ataxia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.4, p.200-202, 2011.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoan and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S.J. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, 3 ed., Philadelphia: SAUNDERS, W.B., p. 265-297, 1989.

SWARDSON, C. J.; KOCIBA, G. J.; PERRYMAN, L. E. Effects of equine infectious anemia virus on hematopoietic progenitors in vitro. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1176–1179, 1992.

SWERCZEK, T.W. Recognizing the common causes of equine abortion: An overview. **Veterinary Medicine**, p.1019-1024, 1991.

SWERCZEK, T.W.; DENNIS, S.M. Equine herpesvirus infections. In: YOUNGQUIST, R.S., THRELFALL, W.R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2 ed. St. Louis: Elsevier; p. 176–80, 2007.

TASHIJAN, R.J. & CRUSBERG, T.C. Equine infectious anemia as an AIDS animal model. **Equine Veterinary Science**, v.9, n.2, p.105-110, 1989.

TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. **Parasitologia**, v.49, p.7-15, 2007.

TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. **Parassitologia**, v.49, p.7-15, 2007.

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.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**, v.31, n.2, p.217-220, 2001.

THOMASSIAN, A. Enfermidades Infecciosas In: **Enfermidades dos Cavalos**. 4 ed. Ed. Livrarias Varela, 2005.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H.; MURPHY, T.W.; ROBERTS, A.W.; WILLARD, J.G.; CARSWELL, G.D. The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.35, p.95-102, 1987.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**, 8 ed. Cornell University Press, Ithaca, p.951, 1988.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.9, p.295–309, 1993.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.2, p.97-100, 1996.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Transrectal Ultrasonography of the Placenta in Normal Mares and Mares with Pending Abortion: A Field Study. In: **Proceedings of the 43rd annual convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP)**, p.256–258, 1997.

TROEDSSON, M.H. Ultrasonographic evaluation of the equine placenta. **Pferdeheilkunde**, v.17, p.583, 2000.

TROEDSSON, M.H.T.; SAGE, A.M. Fetal/Placental Evaluation in the Mare. In: **Recent Advances in Equine Reproduction**, Ithaca, New York: IVIS, 2001.

TROEDSSON, M.H.T. Placentitis. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: Saunders, W.B., 5 ed., p. 297-300, 2003.

TURNER,C.B.;SAVVA, D. Evidence of *Toxoplasma gondii* in an equine placenta. **Veterinary Record**, v.127, p.96, 1990.

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

TURNER,C.B. & SAVVA, D. Transplacental infection of a foal with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Record**, v.131, p. 179-180, 1992.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.; JAKUBEK, E.B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal of Parasitology**, v.28, n.9, p.1467-1472, 1998.

VAALA, W.E.; HAMIR, A.N.; DUBOVI, E.J. et al. Fatal, congenitally acquired infection with equine arteritis virus in a neonatal Thoroughbred. **Equine Veterinary Journal**, v.24, p.155-8, 1992.

VARDELEON, D.; MARSH, A.E.; THORNE, J.G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v.95, n.2-4, p.273-282, 2001.

VERONESI, F.; DIAFERIA, M.; MANDARA, M.T.; MARENZONI, M.L.; CITTADINI, F.; PIERGILI FIORETTI, D. *Neospora* spp. infection associated with equine abortion and/or stillbirth rate. **Veterinary Research Communications**, v.32, p. 223–226, 2008.

VILLALOBOS, E.M.C.; UENO, T.E.H.; SOUZA, S.L.P.; CUNHA, E.M.S.; LARA, 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.

VITOR, R.W.A.; PINTO, J.B. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.42, n.2, p.147-154, 1991.

WADA, R.; FUKUNAGA, Y.; KANEMARU, T.; KONDO, T. Histopathological and immunofluorescent studies on transplacental infection in experimentally induced abortion by equine arteritis virus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.43; p.65-74, 1996.

WALSH, C.P.; DUNCAN, R.B.; ZAJAC, A.M.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils, and dogs. **Veterinary Parasitology**, v.92, n.2, p.119-128, 2000.

WEIBLEN, R. Doenças Víricas. Anemia Infecciosa Equina. IN: RIET-CORREA F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2 ed., v.1, São Paulo: Editora Varela, p.49-55, 2001.

WOBESER, B.K.; GODSON, D.L.; REJMANEK, D.; DOWLING, P. Equine protozoal myeloencephalitis caused by *Neospora hughesi* in an adult horse in Saskatchewan. **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, n.8, p.851-853, 2009.

WORKING PARTY ON TERMINOLOGY, Recommendations. **Journal of Reproduction and Fertility** , v. 35, p. 647-652, 1982.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primes for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally 93 infected nude mice by the polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279. 1996.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR- based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**. v. 4, p. 337-348, 2004.

CAPÍTULO I

OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. E CONTRA *Toxoplasma gondii* EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS E FATORES DE RISCO PARA A SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp.

RESUMO

As principais causas de aborto diagnosticadas por infecção feto-placentária em éguas são causadas por bactérias, vírus e fungos. O aborto causado por protozoário não é comum em equinos, quando comparado com bovinos. A neosporose está entre uma das principais causas de aborto em bovinos. Na espécie equina, o protozoário *Neospora* sp. raramente é incluído como agente etiológico. A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes à infecção pelo parasita *T. gondii* e apesar de não ser muito frequente este protozoário pode causar aborto em éguas. O presente estudo teve por objetivos selecionar propriedades com histórico de falhas reprodutivas em éguas, sem diagnóstico definitivo, verificar a associação entre soropositividade aos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* e a ocorrência de falhas reprodutivas e relacionar a presença de cães e de bovinos como fatores de risco para a soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas. Foram colhidas amostras sanguíneas de 112 éguas, sendo 35 éguas com histórico de falhas reprodutivas, incluindo aborto, reabsorção embrionária e natimorto e 77 éguas sem histórico de falhas reprodutivas, provenientes de cinco propriedades, localizadas nos Estados do Paraná e de Santa Catarina. Amostras de sangue foram colhidas de 45 bovinos e 19 cães. Os soros obtidos foram mantidos a -20°C . As amostras de soro foram analisadas para presença de anticorpos IgG contra *N. caninum* (NC-1) e *T. gondii* (RH) através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), nas diluições 1:50 e 1:100. Na diluição 1:50, as soroprevalências de *Neospora* sp. foram 25,71% (9/35), nas éguas com histórico de falhas reprodutivas e 6,49% (5/77), nas éguas sem histórico de falhas reprodutivas. As soroprevalências de *N. caninum* nos bovinos e nos cães foram de 24,44% (11/45) e 10,52% (2/19), respectivamente. Em todas as propriedades (100%) pelo menos uma égua foi soropositiva. Os animais soropositivos na diluição 1:50 foram testados na diluição 1:100 e somente os bovinos foram soropositivos, 15,55% (7/45). As soroprevalências de *T. gondii* foram de 2,85% (1/35), nas éguas com histórico de falhas reprodutivas, 1,29% (1/77), nas éguas sem histórico de falhas reprodutivas e, 31,57% (6/19), nos cães. Na diluição 1:100 somente os cães permaneceram soropositivos com prevalência de 5,26% (1/19). Através do teste qui-quadrado, com um nível de significância de $\alpha=0,05$, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas e a soroprevalência de *Neospora* sp. ($X^2= 8,1276$; $p= 0,00436$). Para *T. gondii* não houve diferença estatística significativa entre as éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas. Não foi observada diferença estatística significativa entre a presença de cães e a soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas ($X^2 = 0,8457$; $p =0,3578$). A presença de bovinos, apesar de não ser uma variável frequentemente avaliada nos estudos de soroprevalência de *Neospora* sp. em equinos, foi considerada como fator de risco, com diferença estatisticamente significativa em relação à presença destes animais e a soropositividade das éguas ($X^2= 9,3414$; $p = 0,00224$). A soropositividade de éguas, bovinos e cães indica a exposição ao protozoário *Neospora* sp., não podendo ser descartada seu envolvimento na patogênese do aborto em éguas.

Palavras- chave: *Neospora* sp. *Toxoplasma gondii*. Soroprevalência. Falha reprodutiva. Éguas.

ABSTRACT

The main causes of abortion diagnosed by fetal-placental infection in mares are caused by bacteria, virus and fungi. Abortion caused by protozoan is not common in horses. The neosporosis is among the leading causes of abortion in cattle. In equine species, the protozoan *Neospora* sp. is rarely included as an etiologic agent. Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis, horses are among the domestic species most resistant to infection by the parasite *T. gondii* and although not very frequent this protozoan may cause abortion in mares. The present study aimed to select properties with a history of reproductive failure in mares, without a definitive diagnostic, investigate the association between seropositivity to protozoa *Neospora* sp. and *T. gondii* and reproductive failure in mares and relate the presence of dogs and cattle as risk factors for seroprevalence of *Neospora* sp. in mares. Blood samples were collected from 112 mares, 35 mares with a history of reproductive failure, including abortion, embryonic death and stillbirth and 77 mares with no history of reproductive failure, from five properties located in the states of Paraná and Santa Catarina. Blood samples were collected from 45 cattle, and 19 dogs. The sera obtained were stored at - 20 ° C. Serum samples were analyzed for the presence of IgG antibodies to *N. caninum* (NC-1) and *T. gondii* (RH) by indirect immunofluorescence, in dilutions 1:50 and 1:100. At 1:50 dilution, the seroprevalence of *Neospora* sp. was 25.71% (9/35) in mares with a history of reproductive failure, 6.49% (5/77) in mares with no history of reproductive failure. The seroprevalence of *N. caninum* in cattle and dogs was 24.44% (11/45) and 10.52% (2/19), respectively. In all properties (100%) at least one mare was seropositive. The seropositive animals at 1:50 dilution were tested at 1:100 dilution and only cattle were seropositive, 15.55% (7/45). The seroprevalence of *T. gondii* were 2.85% (1/35) in mares with a history of reproductive failure, 1.29% (1/77) in mares with no history of reproductive failure, and 31.57% (6 / 19), in dogs. At 1:100 dilution only dogs remained seropositive prevalence of 5.26% (1/19). Using the chi-square test, with a significance level of $\alpha = 0.05$, there was a statistically significant difference between mares with and without a history of reproductive failure and seroprevalence of *Neospora* sp. ($X^2 = 8.1276$, $p = 0.00436$). For *T. gondii* there was no statistically significant difference between mares with and without a history of reproductive failure. There was no statistically significant difference between the presence of dogs and the seroprevalence of *Neospora* sp. in mares ($X^2 = 0.8457$, $p = 0.3578$). The presence of cattle, although it is not a variable often evaluated in seroprevalence studies of *Neospora* sp. in horses, was considered as a risk factor, which was statistically significant for the presence of these animals and seropositive mares ($X^2 = 9.3414$, $p = 0.00224$). Seropositivity of mares, cattle and dogs indicates exposure to protozoan *Neospora* sp., and it cannot be ruled out its involvement in the pathogenesis of abortion in mares.

Keywords: *Neospora* sp. *Toxoplasma gondii*. Seroprevalence. Reproductive failure. Mares.

1 INTRODUÇÃO

As principais causas de aborto diagnosticadas por infecção feto-placentária em éguas são causadas por bactérias, vírus e fungos (LAUGIER *et al.*, 2011). O aborto causado por protozoário não é comum em equinos, principalmente quando comparado com bovinos (LU *et al.*, 2006). A neosporose desde que foi descoberta em 1988 é reconhecida em todo o mundo como uma importante causa de aborto e mortalidade neonatal em bovinos, responsável por grandes prejuízos econômicos (DUBEY; SCHARES *et al.*, 2011).

A neosporose é uma doença causada pelos protozoários *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988) e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998), parasitas intracelulares obrigatórios. Pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae, assim como os gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Besnoitia* (ELLIS *et al.*, 1994, MARSH *et al.*, 1998).

Dubey *et al.* (1999a) demonstraram que cães e bovinos se infectam com a mesma espécie, *N. caninum*. Este parasito em cães é responsável por graves alterações neurológicas (DUBEY *et al.*, 1999b). Nos equinos, *N. caninum* e *N. hughesi* são infectantes, sendo que a infecção por *N. caninum* tem sido associada a problemas reprodutivos e doença neonatal, e a infecção por *N. hughesi* a distúrbios neurológicos (LINDSAY, 2001; KLIGLER *et al.*, 2007; VERONESI *et al.*, 2008).

Os anticorpos contra *N. hughesi* apresentam reação cruzada com *N. caninum* e vice-versa (MARSH *et al.*, 1996). A diferenciação das duas espécies não pode ser realizada pelos métodos sorológicos (MARSH *et al.*, 1996; JAKUBEK *et al.*, 2006; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

Os hospedeiros definitivos do *N. caninum* são os cães domésticos (McALLISTER *et al.*, 1998), e alguns canídeos selvagens como: coiotes (GONDIM *et al.*, 2004) e, mais recentemente, dingos (KING *et al.*, 2010) e lobos-cinzentos (DUBEY *et al.*, 2011). O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* ainda não foi determinado, permanecendo incerta a forma de exposição dos cavalos a este parasito (HOANE *et al.*, 2006).

O *N. caninum* só teve seu ciclo de vida elucidado em 1998 (McALLISTER *et al.*, 1998). O cão desempenha papel fundamental na epidemiologia da neosporose por ser o hospedeiro definitivo deste protozoário. Dessa forma os canídeos

representam um fator de risco confirmado na transmissão da infecção para os rebanhos bovinos e para outros animais hospedeiros intermediários (BASSO *et al.*, 2001).

Diversas espécies animais foram descritas como hospedeiros intermediários do *N. caninum* entre eles, cães, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, galinhas, cervos, ratos silvestres, raposas, entre outros (DUBEY; LINDSAY, 1996; PETERS *et al.*, 2001; ALMERIA *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; FURUTA *et al.*, 2007).

A transmissão de *N. caninum* nos hospedeiros definitivos ocorre através da ingestão de tecidos do hospedeiro intermediário contendo cistos com bradizoítas viáveis (McALLISTER, 1998). A transmissão deste parasita nos hospedeiros intermediários pode acontecer horizontalmente, através da ingestão de oocistos que são eliminados pelo hospedeiro definitivo, ou verticalmente, através da transmissão transplacentária (DUBEY *et al.*, 2007). A infecção congênita é a principal forma de transmissão em bovinos, e pode ocorrer em gestações e gerações sucessivas, mantendo a infecção no rebanho (DUBEY; SCHARES, 2006; INNES *et al.*, 2007). A transmissão transplacentária de *Neospora* sp. em equinos já foi comprovada, porém poucos estudos foram realizados, não esclarecendo a relevância deste tipo de transmissão em populações equinas (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; VERONESI *et al.*, 2008; TOSCAN *et al.*, 2010; PUSTERLA *et al.*, 2011).

Diferenças entre a frequência de ocorrência de anticorpos contra *Neospora* sp. em grupos de éguas que abortaram e que não abortaram foram observadas por McDole e Gay (2002), Pitel *et al.* (2003a), Duarte *et al.* (2004) e Villalobos *et al.* (2006), sugerindo a participação do *Neospora* sp. nos casos de aborto em éguas. Em Israel, Kligler *et al.* (2007) encontraram maior prevalência de *Neospora* sp. em éguas que passaram por episódios de aborto e em cavalos com distúrbios neurológicos se comparados a equinos assintomáticos.

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908), sendo esta a única espécie capaz de produzir a doença em todos os hospedeiros. É caracterizada como uma doença parasitária de mamíferos, aves e répteis que afeta principalmente o sistema nervoso central, e ocasionalmente o sistema reprodutor, músculos esqueléticos e

órgãos viscerais. A maioria das infecções é inaparente ou latente (HILL *et al.*, 2005). Os hospedeiros definitivos são os felídeos, domésticos e selvagens, pois neles ocorre o ciclo sexuado do parasito, com a eliminação de oocistos que no ambiente esporulam e se tornam infectantes (KAWAZOE, 2005).

A doença foi comprovada em todas as áreas zoogeográficas em cerca de 200 espécies de mamíferos. Muitas espécies de aves também albergam o parasito, além do que quase todas as espécies de animais homeotérmicos são susceptíveis ao protozoário *T. gondii*, ainda que em diferentes graus (HILL *et al.*, 2005), e podem apresentar índices de prevalência bastante variáveis (DE MOURA *et al.*, 2009).

Os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes à infecção pelo parasita *T. gondii* e apesar de não ser muito frequente podem apresentar alguns sinais clínicos, caracterizados por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e aborto (TURNER; SAVVA, 1991).

Estudos sobre infecções experimentais de toxoplasmose foram realizados em equinos, Marques *et al.* (1998) inocularam por via oral, oocistos esporulados de *T. gondii* em nove éguas gestantes e os sinais clínicos observados foram hipertermia, falta de apetite, prostração, diarreia, secreção ocular mucosa e corrimento nasal seroso. A parasitemia foi detectada entre os dias 2 e 47 após inoculação e a resposta imune humoral inciou-se por volta do 10º DPI e os maiores títulos ocorreram após o 20º DPI. Spósito Filha *et al.* (1992) observaram hipertermia e secreção ocular após infecção experimental de *T. gondii* em equinos, por via endovenosa.

Morfológicamente, *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos: a) taquizoítas, que podem ser encontrados individualmente ou agrupados, b) bradizoítas, que são encontrados englobados nos cistos teciduais, e c) esporozoítas que estão contidos nos oocistos (DUBEY *et al.*, 1998).

Ao ingerir qualquer das três formas morfológicas do *T. gondii*, os gatos infectados desenvolverão e eliminarão oocistos, principalmente quando infectados por cistos teciduais contendo bradizoítas (DUBEY *et al.*, 1996). Na fase de eliminação fecal, o gato contamina o ambiente com cerca de 100.000 oocistos por grama de fezes. Os oocistos são excretados por apenas uma ou duas semanas, mas podem permanecer viáveis por até dois anos quando em condições de temperatura e umidade favoráveis, devido à sua resistência aos agentes físicos e

químicos. Ainda no solo, os oocistos podem ser carregados mecanicamente por moscas, baratas, besouros e minhocas, além de ficarem viáveis em frutas e vegetais por longos períodos (FREYRE *et al.*, 1993; KNIEL *et al.*, 2002).

No Brasil, a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em equinos clinicamente sadios variou de 4,4%, no Rio de Janeiro, (GAZÊTA *et al.* 1997) a 41,5%, no estado de São Paulo (VIDOTTO *et al.*, 1997). Em equinos com histórico de ataxia a prevalência de *T. gondii* foi de 34,78% (STELMANN *et al.*, 2011). No Paraná, Locatelli-Dittrich *et al.* (2006) encontraram 2,7% de soroprevalência de *T. gondii* em éguas.

Os objetivos do presente estudo foram selecionar propriedades com histórico de falhas reprodutivas em éguas, verificar a associação entre soropositividade aos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* e a ocorrência de falhas reprodutivas e relacionar a presença de cães e de bovinos como fatores de risco para a soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ESCOLHA DAS PROPRIEDADES

A escolha das propriedades baseou-se no histórico de falhas reprodutivas em éguas sem diagnóstico conclusivo. Foram selecionadas cinco propriedades de criação de equinos das raças Crioula, Mangalarga Marchador e Puro Sangue Inglês, o manejo reprodutivo utilizado era cobertura natural e inseminação artificial. As doenças que foram investigadas no ano de 2010 foram herpesvírus equino tipo 1, leptospirose e arterite viral equina. Os resultados foram negativos para essas doenças. Nas éguas com histórico de falhas reprodutivas foram realizados exames clínicos ginecológicos para avaliação do trato reprodutivo e nos casos de falhas reprodutivas recentes, descartar o envolvimento de outros agentes infecciosos responsáveis por causar aborto, principalmente bactérias e fungos. Nenhuma das éguas examinadas apresentou sinais sugestivos de endometrite.

2.2 ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo para pesquisa de anticorpos contra *Neospora* sp. e *T. gondii* foi realizado em cinco propriedades, sendo uma localizada na região Metropolitana de Curitiba, duas localizadas no mesmo município situado na região Centro-Oriental do Paraná e duas no Norte de Santa Catarina, em cidades vizinhas (figuras 1 e 2). Todas com histórico de falhas reprodutivas recentes (2011) em éguas.

Das cinco propriedades selecionadas, quatro possuíam cães, que tinham acesso a todas as instalações e piquetes das éguas. E em apenas uma propriedade (2), equinos, bovinos e cães conviviam no mesmo ambiente. O estudo sorológico também foi realizado nos cães (propriedades 1, 2, 3 e 4) e nos bovinos (propriedade 2).

As éguas eram das raças Crioula, Mangalarga Marchador e Puro Sangue Inglês, o sistema de criação utilizado era semi-extensivo. Do total de éguas, 35 apresentaram histórico de falhas reprodutivas recentes, sendo 29 com histórico de um ou mais abortos. Os abortos eram registrados principalmente entre o 7º e 9º mês de gestação, dois casos de éguas com reabsorção embrionária e quatro casos de natimortos. E setenta e sete éguas não apresentaram histórico de falhas reprodutivas recentes.

Os bovinos analisados eram fêmeas da raça Nelore, que apresentavam histórico de aborto no segundo terço da gestação. O agente etiológico dos abortos nesta espécie não havia sido determinado. Os bovinos eram vacinados contra as principais doenças que causam problemas reprodutivos em vacas como Brucelose, Diarréia Viral Bovina, Febre Aftosa, Leptospirose e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina.

Duas propriedades (4 e 5) apresentavam histórico de equinos com sinais neurológicos, incluindo ataxia e incoordenação motora, cuja causa não havia sido identificada. Em uma delas os proprietários relataram problemas neurológicos em cães (propriedade 2).

A localização de cada propriedade e o total de equinos, cães e bovinos que foram analisados sorologicamente para *Neospora* sp. e *T. gondii* por propriedade encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1- LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES AVALIADAS

PROPRIEDADE	LOCALIZAÇÃO (ESTADO)	LATITUDE	LONGITUDE
1	Centro-Oriental (PR)	25°38'74" S	50°00'01" W
2	Metropolitana de Curitiba (PR)	25°75'53" S	49°72'54" W
3	Norte (SC)	26°11'84" S	50°39'15" W
4	Norte (SC)	26°08'39" S	50°31'32" W
5	Centro-Oriental (PR)	25°38'74" S	50°00'01" W

TABELA 2- NÚMERO DE EQUINOS, CÃES E BOVINOS ANALISADOS POR PROPRIEDADE

PROPRIEDADE	EQUINOS	CÃES	BOVINOS
1	60	08	-
2	22	07	45
3	10	02	-
4	11	02	-
5	09	-	-
TOTAL	112	19	45



FIGURA 1 – MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

FONTE: <http://www.o-parana.net/diretorio/>



FIGURA 2 – MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

FONTE: <http://pt.wikipedia.org/>

2.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

As amostras de sangue foram colhidas de 112 éguas, 45 vacas e 19 cães, entre os anos de 2010 e 2011. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular de equinos e cães, e da veia caudal de bovinos em tubos sem anticoagulante. Os tubos contendo as amostras sanguíneas foram centrifugados a 4.000 g por 5 minutos, os soros foram separados em alíquotas e congelados a -20° C, em microtubos de polipropileno (tipo Eppendorf) para a sua conservação e manutenção, até o momento da análise sorológica.

2.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI

A reação de imunofluorescência indireta foi empregada para pesquisa de anticorpos contra *Neospora* sp. e *T. gondii*.

O método da IFI é considerado um teste padrão para diagnóstico sorológico da neosporose. Baseia-se na detecção de anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular dos taquizoítas inteiros de *N. caninum* fixados nos orifícios da lâmina de IFI (Anexo 1). Em seguida, utiliza-se um antisoro específico para cada espécie, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, para formar um complexo imune estável. A presença desta reação pode ser detectada pela observação da fluorescência dos taquizoítas, em um microscópio de fluorescência.

Para confecção das lâminas de imunofluorescência foram utilizadas as cepas de referência NC-1 de *N. caninum*, cedida pela Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich, sendo a cepa proveniente do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade de Madison-Wisconsin, EUA e a cepa RH de *T. gondii*, cedida pelas Professoras Dra. Vanete Thomaz Soccol e Dra. Edilene Alcântara de Castro, proveniente do CDME, ambas produzidas *in vitro* no laboratório de Patologia Clínica do HV da UFPR. O ponto de corte adotado nesse estudo foi o mesmo para *Neospora* sp. e *T. gondii* (1:50) para todas as amostras.

Os soros dos equinos, bovinos e cães foram diluídos inicialmente 1:50, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,2), e distribuídos nas lâminas, segundo a técnica da IFI (Anexo 2). As amostras positivas na diluição 1:50 foram testadas posteriormente na diluição 1:100. Foram utilizados os seguintes conjugados: anti-IgG de equino (Sigma ®), na diluição 1:130; anti-IgG de bovino (Sigma ®), na diluição 1:110; e anti-IgG canino (Sigma ®), na diluição 1:130, para equinos, bovinos e cães, respectivamente. As amostras consideradas positivas foram as que apresentaram uma fluorescência em toda a superfície do taquizoíta (fluorescência total). Aquelas que apresentaram fluorescência apenas em uma porção do taquizoíta foram consideradas negativas (fluorescência apical).

Os soros controles positivo e negativo para *N. caninum* e *T. gondii* previamente conhecidos, de equinos, bovinos e cães foram incluídos em cada lâmina de IFI, de acordo com a espécie analisada. Esses soros foram obtidos das análises sorológicas previamente realizadas no laboratório de Patologia Clínica do HV da UFPR.

Para análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o teste do qui-quadrado, para investigar as relações entre soropositividade aos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* e a perda reprodutiva em éguas e a presença de cães e de

bovinos e a prevalência de anticorpos contra *Neospora* sp. nas éguas. Os resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. O grau de associação entre as variáveis foi estimado através do cálculo do intervalo de Odds Ratio, utilizando-se o software estatístico R-Project.

3 RESULTADOS

3.1 SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp. E *T. gondii* NAS ÉGUAS

Os resultados da soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas foi 12,50% (14/112) e de *T. gondii* foi 1,78% (2/112). A soroprevalência para esses dois protozoários nas éguas, analisadas por propriedade, encontra-se na tabela 3. As soroprevalências de *Neospora* sp. nas éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas, foram de 25,71% (9/35) e 6,49% (5/77), respectivamente, e de *T. gondii* foram de 2,85% (1/35) e 1,29% (1/77), respectivamente. Nenhuma amostra positiva na diluição 1:50 foi positiva na diluição 1:100, tanto para *Neospora* sp. quanto *T. gondii*.

TABELA 3- SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. E CONTRA *T. gondii* NAS ÉGUAS EXAMINADAS POR PROPRIEDADE

PROPRIEDADES	ANIMAIS	CONTRA <i>Neospora</i> sp.				CONTRA <i>T. gondii</i>			
		1:50	%	1:100	%	1:50	%	1:100	%
1	60	2	3,33	0	0	0	0	0	0
2	22	7	31,81	0	0	2	9,09	0	0
3	10	2	20	0	0	0	0	0	0
4	11	1	9,09	0	0	0	0	0	0
5	9	2	22,22	0	0	0	0	0	0
Total	112	14	12,50	0	0	2	1,78	0	0

Analisando as éguas soropositivas para *Neospora* sp. verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as éguas com e sem histórico de falhas

reprodutivas ($X^2= 8,1276$; $p= 0,00436$) (tabela 4). Para *T. gondii* não houve diferença estatisticamente significativa.

TABELA 4 - SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS, PROVENIENTES DAS CINCO PROPRIEDADES ANALISADAS NOS ESTADOS DO PARANÁ E DE SANTA CATARINA

FALHAS REPRODUTIVAS	<i>Neospora</i> sp.		SOROPREVALÊNCIA (%)
	ÉGUAS SOROPOSITIVAS	ÉGUAS SORONEGATIVAS	
SIM	9	26	25,71 ^a
NÃO	5	72	6,49 ^b
TOTAL	14	98	12,50

NOTA: Letras diferentes e sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa. OR: 4,98; $p < 0, 05$

Os resultados sorológicos contra *Neospora* sp. e contra *T. gondii* nas éguas e a falha reprodutiva apresentada individualmente, separado por propriedade está descrito na tabela 5.

TABELA 5- FALHAS REPRODUTIVAS E RESULTADOS SOROLÓGICOS NA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. E CONTRA *T. gondii* NAS ÉGUAS EM CADA PROPRIEDADE AVALIADA

Propriedades	Éguas	Falha reprodutiva	Resultado <i>Neospora</i> sp.	Título	Resultado <i>T. gondii</i>	Título
1	E1	aborto	neg	-	-	-
	E2	aborto	pos	1:50	-	-
	E3	natimorto	neg	-	-	-
	E4	natimorto	neg	-	-	-
	E5	natimorto	neg	-	-	-
	E6	natimorto	neg	-	-	-
2	E7	aborto	neg	-	-	-
	E8	aborto	pos	1:50	-	-
	E9	aborto	neg	-	-	-
	E10	aborto	pos	1:50	pos	1:50
	E11	aborto	neg	-	-	-
	E12	aborto	pos	1:50	-	-
	E13	aborto	neg	-	-	-
	E14	aborto	pos	1:50	-	-
	E15	aborto	neg	-	-	-
	E16	aborto	pos	1:50	-	-
3	E17	aborto	neg	-	-	-
	E18	aborto	neg	-	-	-
	E19	aborto	neg	-	-	-
	E20	aborto	neg	-	-	-
	E21	aborto	pos	1:50	-	-
	E22	aborto	neg	-	-	-
	E23	aborto	neg	-	-	-
	E24	aborto	neg	-	-	-
	E25	aborto	pos	1:50	-	-
4	E26	aborto	neg	-	-	-
	E27	aborto	neg	-	-	-
	E28	aborto	neg	-	-	-
	E29	aborto 2x	neg	-	-	-
	E30	aborto 3x	neg	-	-	-
	E31	aborto	pos	1:50	-	-
	E32	reabsorção	neg	-	-	-
	E33	reabsorção	neg	-	-	-
5	E34	aborto	neg	-	-	-
	E35	aborto	neg	-	-	-

3.2 SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp. E *T. gondii* NOS BOVINOS E CÃES

Nos bovinos (propriedade 2), as soroprevalências de anticorpos contra *N. caninum*, nas diluições 1:50 e 1:100, foram de 24,44% (11/45) e 15,55% (7/45), respectivamente. Nenhuma amostra foi soropositiva para *T. gondii*.

A soroprevalência de *N. caninum* e *T. gondii* em cães, na diluição 1:50, foi 10,52% (2/19) e 31,57% (6/19), respectivamente. E na diluição 1:100, nenhuma amostra foi soropositiva para *N. caninum* e 5,26% (1/19) foi soropositiva para *T. gondii* (Tabela 6). Dois cães foram soropositivos para ambos protozoários (10,52%).

TABELA 6- SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *N. caninum* E CONTRA *T. gondii* DOS BOVINOS DA PROPRIEDADE 2 E DOS CÃES DAS PROPRIEDADES 1, 2 3 E 4 ANALISADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

ESPÉCIE	ANIMAIS	CONTRA <i>N.caninum</i>				CONTRA <i>T. gondii</i>			
		1:50	%	1:100	%	1:50	%	1:100	%
BOVINOS	45	11	24,44	7	15,55	0	0	0	0
CÃES	19	2	10,52	0	0	6	31,57	1	5,26
TOTAL	64	13	-	7	-	6	-	1	-

Todos os bovinos e cães que foram soro reagentes tanto para *N. caninum* quanto para *T. gondii* são provenientes da mesma propriedade (propriedade 2), a que apresentou maior soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* sp. nas éguas. Nesta propriedade, a soroprevalência de *N. caninum* nos cães foi 28,57% (2/7), de *T. gondii* foi 85,71% (6/7) e para ambos protozoários foi 28,57% (2/7). Considerando apenas as éguas com histórico de falhas reprodutivas nessa propriedade, a soroprevalência de *Neospora* sp. foi de 50% (5/10). Os resultados da soroprevalência na propriedade 2 nas éguas com histórico de falhas reprodutivas, bovinos e cães encontram-se na figura 3.

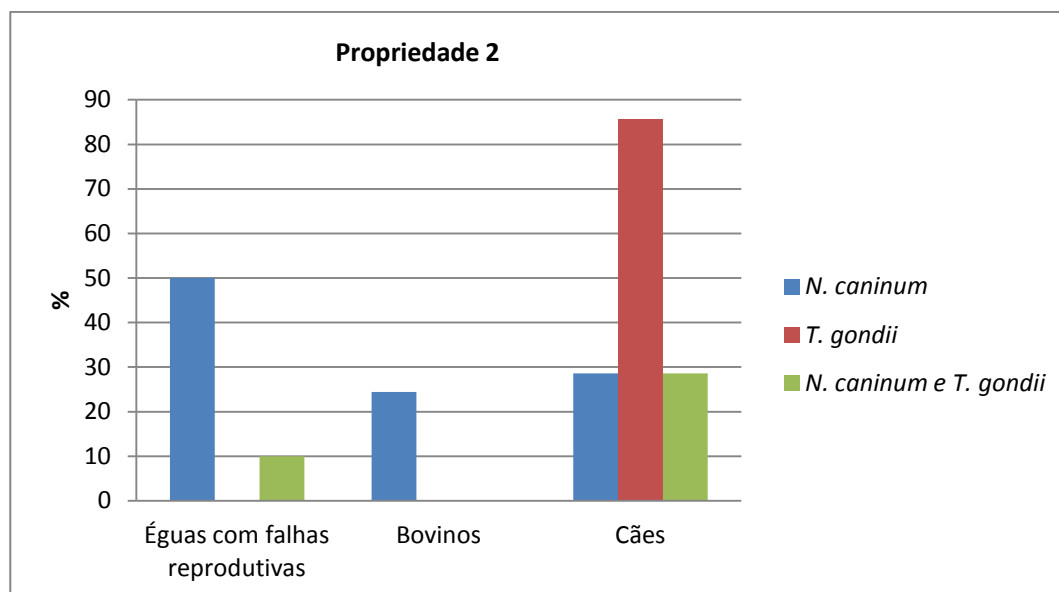


FIGURA 3 – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. E CONTRA *T. gondii* EM ÉGUAS COM FALHAS REPRODUTIVAS, BOVINOS E CÃES DA PROPRIEDADE 2

Não foi observada diferença estatística significativa entre a presença de cães e a soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas ($X^2 = 0,8457$; $p = 0,3578$) (tabela 7). A comparação entre as soroprevalências de *Neospora* sp. nas éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas de acordo com a presença de cães nas propriedades encontra-se na figura 4.

TABELA 7- SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. EM ÉGUAS PROVENIENTES DAS CINCO PROPRIEDADES ANALISADAS, DE ACORDO COM PRESENÇA OU NÃO DE CÃES NA PROPRIEDADE

PRESENÇA DE CÃES	TOTAL DE ÉGUAS	ÉGUAS SOROPOSITIVAS	SOROPREVALÊNCIA (%)
SIM	103	12	11,65
NÃO	9	2	22,22
TOTAL	112	14	12,50

OR: 0,46; $p > 0,05$

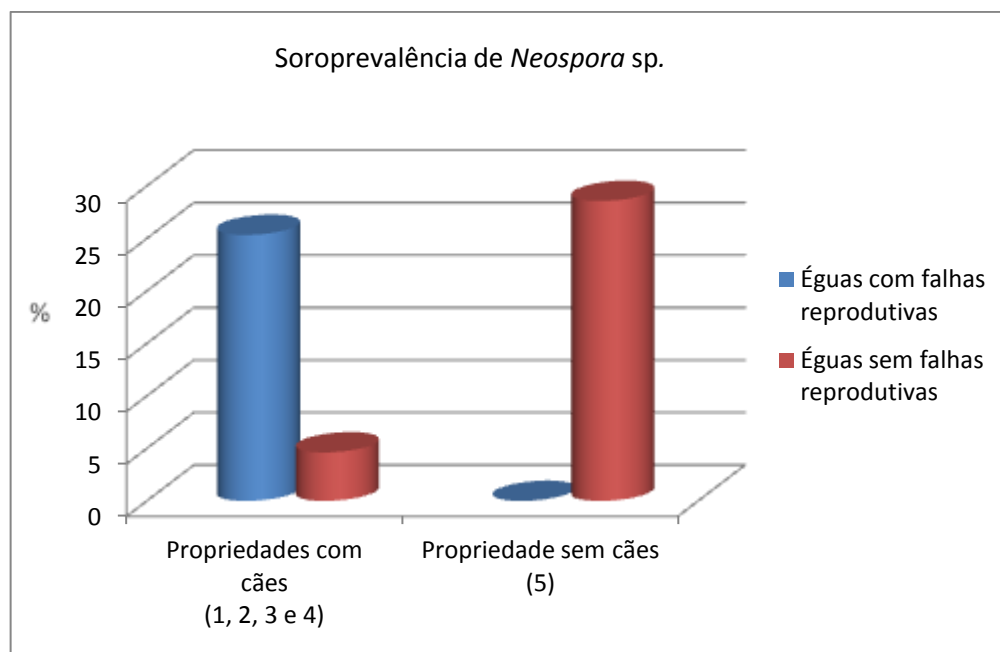


FIGURA 4- MÉDIA DA SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp. EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS NAS PROPRIEDADES COM CÃES (1, 2, 3 E 4) E SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp. EM ÉGUAS COM E SEM HISTÓRICO DE FALHAS REPRODUTIVAS NA PROPRIEDADE SEM CÃES (5)

Verificou-se diferença estatisticamente significativa em relação à presença de bovinos e a soropositividade das éguas para *Neospora* sp. ($X^2 = 9,3414$; $p = 0,00224$) (tabela 8).

TABELA 8 – FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora* sp. EM ÉGUAS PROVENIENTES DAS CINCO PROPRIEDADES ANALISADAS, DE ACORDO COM PRESENÇA OU NÃO DE BOVINOS NA PROPRIEDADE

PRESENÇA DE BOVINOS	TOTAL DE ÉGUAS	ÉGUAS POSITIVAS	SOROPREVALÊNCIA (%)
SIM	22	7	31,81 ^c
NÃO	90	7	7,77 ^d
TOTAL	112	14	12,5

NOTA: Letras diferentes e sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa. OR: 5,53; $p < 0,05$

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que *Neospora* sp. está presente na população de éguas analisadas, sendo pela primeira vez detectado anticorpos contra *Neospora* sp. em éguas no estado de Santa Catarina. A soroprevalência de *Neospora* sp. encontrada nas éguas foi 12,50% (14/112). Todas as propriedades (100%) apresentaram pelo menos uma égua soropositiva. Na diluição 1:100, nenhuma amostra foi soropositiva para *Neospora* sp. Em outras pesquisas realizadas a soroprevalência também diminuiu na diluição 1:100 (CIARAMELLA *et al.*, 2004; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006).

Considerando apenas as éguas com histórico de falhas reprodutivas, a soroprevalência de *Neospora* sp. foi de 25,71% (9/35), resultado este superior ao encontrado por Villalobos *et al.* (2006), no estado de São Paulo, que relataram a ocorrência de 15,1% de positividade ao *N. caninum* pela RIFI, em éguas que apresentaram desordens reprodutivas. Nas éguas sem histórico de falhas reprodutivas a soroprevalência de *Neospora* sp. foi de 6,49% (5/77). Verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as éguas com e sem histórico de falhas reprodutivas e a soroprevalência de *Neospora* sp. ($X^2= 8,1276$; $p= 0,00436$). Villalobos *et al.* (2006) também associaram a presença de desordens reprodutivas em éguas com a presença de soropositividade ao protozoário *Neospora* sp. Enquanto que McDole e Gay (2002) e Duarte *et al.* (2004), nos Estados Unidos, e Pitel *et al.* (2003), na França, encontraram uma fraca associação entre soropositividade para *Neospora* sp. e ocorrência de abortos.

A variação de percentuais de éguas positivas ao *Neospora* sp. entre as propriedades foi de 3,33 a 31,81%. Em três propriedades (2, 3 e 5) houve um maior percentual em relação às demais. A propriedade 2, situada na região Metropolitana de Curitiba, é a que apresentou maior soroprevalência de *Neospora* sp. nas éguas (31,81%), considerando apenas as com falhas reprodutivas, a soroprevalência passa para 50% (5/10) e é a única que apresentou cães e bovinos soropositivos ao protozoário, o que pode ter influenciado na soropositividade das éguas. Além disso, essa propriedade apresentava histórico de problemas reprodutivos em vacas e problemas neurológicos em cães, não podendo ser descartado o envolvimento do

Neospora sp. na patogênese do aborto, apesar de um diagnóstico definitivo, obtido a partir do isolamento do agente no feto não ter sido estabelecido.

Nas propriedades 3 e 5, que não apresentaram cães soropositivos ao *N. caninum*, outros fatores poderiam explicar a soropositividade ao protozoário nas éguas, como a possibilidade de outros cães terem acesso aos piquetes das éguas e também a presença de animais silvestres nas propriedades. No Brasil, anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em gambás (YAI *et al.*, 2003), capivaras (YAI *et al.*, 2008), e em canídeos selvagens: lobo-guará (VITALIANO *et al.*, 2004), graxaim-do-campo, cachorro-do-mato (CÂNON-FRANCO *et al.*, 2004) e cachorro-vinagre (MATTOS *et al.*, 2008), porém mais estudos precisam ser realizados para comprovarem o papel desses animais no ciclo da neosporose. A presença de roedores selvagens exerce um papel importante na epidemiologia do parasita, visto que são hospedeiros intermediários do *N. caninum* (HUANG *et al.*, 2004; HUGHES *et al.*, 2006; JENKINS *et al.*, 2007; FERROGLIO *et al.*, 2007), e por apresentarem característica de distribuição cosmopolita, podem ser responsáveis pela disseminação do parasita em curto período, introduzindo-o em regiões e populações ainda não expostas (GONDIM, 2006). Cães e outros canídeos, por exemplo, poderiam manter a infecção após consumo desses animais infectados por cistos teciduais do protozoário, e posteriormente contaminar o ambiente com os oocistos do parasita (FERROGLIO *et al.*, 2007).

Do mesmo modo, relatos de aves figurando como hospedeiros de *N. caninum* têm grande relevância na epidemiologia do parasito. Este fato pode ser interpretado como um encurtamento de distâncias, onde *N. caninum* pode ser introduzido em populações sem nenhum contato prévio, de maneira mais rápida e eficaz do que qualquer medida profilática que possa ser adotada (GONDIM, 2006). Embora não tenha sido ainda provada a capacidade de aves carnívoras comportarem-se como hospedeiros definitivos (BAKER *et al.*, 1995), tal possibilidade não deve ser descartada (GONDIM, 2006).

O ponto de corte adotado para *Neospora* sp. neste estudo para equinos e cães foi o mesmo utilizado por outros autores, que consideraram positivos pela RIFI títulos maiores ou iguais a 1:50 (DUBEY, 1988; CHEADLE *et al.*, 1999; GUPTA *et al.*, 2002; McDOLLE; GAY, 2002; CIARAMELLA *et al.*, 2004; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2006. PLUGGE *et al.*, 2011). A triagem na diluição

1:50 pode resultar em falsos positivos, no entanto, a presença de anticorpos que reagem aos antígenos de *Neospora* sp. pode indicar a exposição ao parasita ou a um parasita muito estreitamente relacionado, com antígenos semelhantes e, não indica necessariamente uma infecção ativa associada com os sinais clínicos da doença (VARDELEON *et al.*, 2001; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006). Em bovinos, o ponto de corte indicativo de infecção ainda não está totalmente padronizado, os mais utilizados são: 1:25, 1:200 a 1:640 em bovinos adultos; para os fetos bovinos e recém-nascidos (amostras pré-colostrais), os valores de 1:80 são indicativos de infecção; para novilhas que receberam o colostro, o ponto de corte é de 1:5.120, dificultando a comparação direta dos resultados (BARR *et al.*, 1995).

Analisando as éguas com histórico de falhas reprodutivas, nenhuma égua soropositiva apresentou títulos de anticorpos maiores que 1:50, porém as colheitas de sangue não foram realizadas imediatamente após o aborto para verificar o título de anticorpos no momento do mesmo. Verificou-se em éguas prenhes uma flutuação no título de anticorpos, indicando que o exame sorológico de neosporose deve ser realizado no 8º e no 11º meses de gestação, para monitorar a sanidade da fêmea gestante (KORMANN *et al.*, 2008).

No estado do Paraná, Locatelli- Dittrich (2002) isolou *Neospora* sp. de dois fetos equinos procedentes de um haras com surto de abortos, em Campo Largo. Em nosso estudo, apenas em dois casos de abortos, os fetos (um de sete meses e outro de nove meses) foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR. Não foram encontradas lesões histopatológicas indicativas de infecção por *Neospora* sp. e ambos não apresentaram anticorpos anti-*Neospora* sp. no soro e nem no líquido. Um dos fetos era da égua (E30) que apresentou três abortos consecutivos. Essa égua apresentava sinais clínicos sugestivos de mieloencefalite equina por protozoário (MEP), como incoordenação motora, ataxia e acabou vindo a óbito, não sendo possível a coleta de material para diagnóstico laboratorial.

No Brasil, os estudos realizados sobre *Neospora* sp. em equinos avaliaram a pesquisa de anticorpos contra esse protozoário em éguas, potros, cavalos de tração e cavalos utilizados em propriedades de criação de bovinos (HOANE *et al.*, 2006; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2006; SANGIONI *et al.*, 2011; VILLALOBOS *et al.*, 2012). Em nenhum desses estudos foi relacionado a

presença de cães e bovinos, como fatores de risco para a soroprevalência de *Neospora* sp. em éguas.

A soroprevalência de *N. caninum* nos bovinos, na diluição 1:50, foi 24,44%, resultados inferiores foram obtidos por Oshiro *et al.* (2007) e Mello *et al.* (2008), ambos estudos realizados no Mato Grosso do Sul, utilizaram a RIFI (1:50) e encontraram 14,9% e 9,17%, respectivamente. Estudos soroepidemiológicos foram realizados com bovinos e cães, os resultados variaram, uma maior soroprevalência de *N. caninum* em bovinos foi encontrada em propriedades que possuíam cães, ressaltando que estes, como hospedeiros definitivos, podem estar envolvidos na transmissão do parasita aos bovinos (PARÉ *et al.*, 1998; SAWADA *et al.*, 1998; WOUDA *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2003). No Brasil, Corbellini *et al.* (2002), Aguiar *et al.* (2006), Locatelli-Dittrich *et al.* (2008) e Benetti *et al.*, (2009) não encontraram associação entre a presença de cães na propriedade e a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* em bovinos.

Das quatro propriedades que possuíam cães e que apresentavam histórico de problemas reprodutivos em éguas, apenas uma apresentou cães soropositivos para *N. caninum*. A alimentação dos cães consistia principalmente de ração comercial e, eventualmente, sobras de alimento humano. Apesar de não ter ocorrido diferença estatisticamente significativa em relação à presença de cães nas propriedades e a soropositividade de *Neospora* sp. em éguas, esse resultado não possibilita excluir o envolvimento desses animais no ciclo da neosporose, uma vez que são os hospedeiros definitivos do parasita (McALLISTER *et al.*, 1998) .

A presença de bovinos foi cogitada como fator de risco a soroprevalência de *Neospora* sp. em éguas, pois como os bovinos são hospedeiros intermediários do parasito (DUBEY; SCHARES, 2006), pode-se considerar a possibilidade dos cães adquirirem a infecção por meio da ingestão de carcaças, fetos e restos placentários contaminados (GONDIM *et al.*, 2002). Consequentemente, ocorreria a liberação de oocistos nas fezes caninas (DUBEY *et al.*, 2002), contaminando o ambiente e possibilitando sua ingestão por equinos, hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 2007). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação à presença dos bovinos e a soropositividade das éguas ($X^2= 9,3414$; $p = 0,00224$). Esse resultado ressalta pela primeira vez a importância que a presença de bovinos podem ter na soroprevalência de *Neospora* sp. em éguas, em propriedades que

apresentem cães. Mais estudos devem ser realizados para comprovar o papel da presença de bovinos na ocorrência da neosporose equina.

A soroprevalência total de *T. gondii* nas éguas foi 1,78% (2/112), indicando uma baixa prevalência. Considerando apenas as éguas com histórico de falhas reprodutivas, a soroprevalência de *T. gondii* foi 2,85% (1/35), resultado semelhante de 2,7% (1/36) foi encontrado por Locatelli-Dittrich *et al.* (2006) em éguas na região metropolitana de Curitiba- PR. Enquanto que Dubey *et al.* (1999c) e Garcia *et al.* (1999) encontraram 15,8% e 12,1%, respectivamente de equinos soropositivos. Não houve diferença estatisticamente significativa de éguas soropositivas para *T. gondii* e a ocorrência de falhas reprodutivas.

5 CONCLUSÕES

1. Em todas as propriedades de equinos avaliadas para presença de anticorpos contra *Neospora* sp. foram detectadas éguas soropositivas, demonstrando a presença deste protozoário nas regiões Metropolitana de Curitiba, Centro-Oriental do Paraná e, pela primeira vez , no Norte de Santa Catarina.
2. Houve associação entre soropositividade ao protozoário *Neospora* sp. e histórico de perdas reprodutivas em éguas. Assim, o protozoário *Neospora* sp. deve ser incluído no diagnóstico diferencial das doenças reprodutivas em éguas.
3. A soroprevalência de anticorpos contra *T. gondii* em éguas foi baixa e não houve diferença estatística significativa entre soropositividade ao *T. gondii* e histórico de perdas reprodutivas em éguas.
4. A presença de bovinos, hospedeiros intermediários de *N. caninum*, em propriedades que apresentem cães, hospedeiros definitivos do protozoário, podem influenciar na soroprevalência de *Neospora* sp. em éguas.

6 PERSPECTIVAS

Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar o impacto do protozoário *Neospora* sp. na reprodução equina. Nos casos de abortos, os fetos devem ser encaminhados para o laboratório para confirmação do *Neospora* sp., como agente etiológico do aborto. O diagnóstico deve ser realizado por isolamento, exame histopatológico e por PCR. É importante também identificar qual espécie de *Neospora*, *N. caninum* ou *N. hughesi* está infectando os equinos.

A presença de cães e de bovinos em propriedades com problemas reprodutivos em éguas deve ser considerada, devido à possibilidade destes animais atuarem como fatores de risco associados à infecção por *N. caninum* em equinos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.; CAMARGO, E.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.1-2, p.71-77, 2006.
- ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABLÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.107, p. 287-294, 2002.
- BAKER, D. G.; MORISHITA, T. Y.; BROOKS, D. L.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v.81, n.5, p. 783-785, 1995.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, n. 137, p. 611-613, 1995.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v.87, p.612-618, 2001.
- BENETTI, A.H.; SCHEIN, F.B.; DOS SANTOS, T.R.; TONIOLLO, G.H.; DA COSTA, A.J.; MINEO, J.R.; LOBATO, J.; DE OLIVEIRA SILVA, D.A.; GENNARI, S.M. Pesquisa de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos leiteiros, caes e trabalhadores rurais da regioao Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.1, p. 29–33, 2009.
- CÂNON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 3-4, p. 275 – 277, 2004.

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.; ROLSMA, M.D.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1537-1543, 1999.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; SANTORO, D.; DI LORIA, A.; RIGATO, R. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1-2, p.11-15, 2004.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.E.F.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.195-202, 2002.

DE MOURA, A.B.; DE SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E.B.; PISETTA, G.M.; JUNIOR, A.H. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 52-56, 2009.

DUARTE, P.C.; CONRAD, P.A.; BARR, B.C.; DAVID WILSON, W.; FERRAROT, G.L.; PACKHAM, A.E.; CARPENTER, T.E.; GARDNER, I.A. Risk of transplacental transmission of *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in California horses. **Journal of Parasitology**, v.90, n.6, p.1345-1351, 2004.

DUBEY, J.P. Neosporosis – the first decade of research. **International Journal of Parasitology**, v.29, n.10, p.1485-1488, 1998.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEECER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.10, p.1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P.; PORTERFIELD, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **International Journal for Parasitology**, Lawrence, v. 76, p.732-734, 1990.

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

DUBEY, J.P.; RIGOULET, J.; LAGOURETTE, P.; GEORGE, C.; LONGEART, L.; LENET, J.L. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). **The Journal of Parasitology**, v.82, n.2, p.338-339, 1996.

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

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

DUBEY, J.P. Neosporosis – the first decade of research. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.1485-1488, 1999b.

DUBEY, J.P.; KERBER, C.E.; GRANSTROM, D.E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n.7, p.970-972, 1999c.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, 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.; MATTISSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPERR, 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 coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.8, p.929-946, 2002.

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

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.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90-108, 2011.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; RAJEDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P.R.; BRINDLEY, P.J.; NIMMO, K.A.; JOHNSON, A.M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.67, n.2, p.341-342, 1994.

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v.148, p. 346-349, 2007.

FREYRE, A.; CHOROMANSKI, L.; FISHBACK, J.L.; POPIEL, I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.79, n.5, p.716-719, 1993.

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infections in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v.134, p.1931-1939, 2007.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, 1:91-97, 1999.

GAZÊTA, G. S.; DUTRA, A. E. A.; NORBERG, A. N.; SERRA-FREIRE, N. M.; SOUZA, W. J. S.; AMORIM, M.; LOPES, L. M. S. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de equinos do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 97-99, 1997.

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, 2004.

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

GUPTA, G.D.; LAKRITZ, J.; KIM, J.H.; KIM, D.Y.; KIM, J.K.; MARSH, A.E. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.193-201, 2002.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**. v. 6, p.41-61, 2005.

HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.; 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, n.2, p.155-159, 2006.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v. 35, p. 283-290, 2004.

HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.; TERRY, R.S.; MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, p. 29-36, 2006.

INNES, E.A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 134, n.13, p. 1903-1910, 2007.

JAKUBEK, E.B.; LUNDE´N, A.; UGGLA, A. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. infections in Swedish horses. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.194–199, 2006.

JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 161-165, 2007.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**, 11 ed. São Paulo, Atheneu, p.494, 2005.

KNIEL, K.E.; LINDSAY, D.S.; SUMNER, S.S.; HACKNEY, C.R.; PIERSON, M.D.; DUBEY, J.P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. **Journal of Parasitology**, v.88, n.4, p.790-793, 2002.

KING, J.S.; SLAPETA, J; JENKINS, D.J.; AL-QASSAB, S.E.; ELLIS, J.T.; WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40,n. 8, p. 945-950, 2010.

KLIGLER,E.B.; SHKAP, V.; BANETH, G.; MILDENBERG, Z.; STEINMAN, A. Seroprevalence of *Neospora* spp. among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.109-113, 2007.

KORMANN, D.C.S.H.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; ANTUNES, J.; DITTRICH, J.R.; PATRÍCIO, L.F.I. Soroprevalência e cinética mensal de anticorpos anti- *Neospora* sp. em éguas gestantes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n. 1, p. 335-338, 2008.

LAUGIER, C.; FOUCHER, N.; SEVIN, C.; LEON, A; TAPPREST, J. A 24-year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 116-123, 2011.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Parasitology**, v. 76, n.3, p. 410-413, 1990.

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

LOCATELLI-DITTRICH R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil. **Tese** (Doutorado em Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D.C.S.; THOMAZ-SOCCOL. 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.

LOCATELLI-DITTRICH, R; MACHADO JR, P.C.; FRIDLUND-PLUGGE, N.; RICHARTZ, R.R.T.B.; MONTIANI-FERREIRA, F.; PATRÍCIO, L.F.L.; PATRÍCIO, M.A.C.; PIEPPE, M. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.191-196, 2008.

LU, K.G.; MORRESEY, P.R. Reproductive tract infections in horses. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 519-552, 2006.

MARQUES, L.C.; COSTA, A.J.; LOPES, C.W.G.; LACERDA NETO, J.C. Experimental toxoplasmosis in pregnant mares: Clinical signs, parasitemia and immunological observations. **Semina: Ciências Agrárias**, v.19, n.1, p.45-49, 1998.

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

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

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 of Parasitology**, v. 28, p. 1473–1478, 1998.

MATTOS, B.C.; PATRÍCIO, L.L.F.; PLUGGE, N.F.; LANGE, R.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p. 267-272, 2008.

MELLO, R.C.; ANDREOTTI, R.; BARROS, J.C.; TOMICH, R.G.P.; MELLO, A.K.M.; CAMPOLIM, A.I.; PELLEGRIN, A.O. Levantamento epidemiológico de *Neospora caninum* em bovinos de assentamentos rurais em Corumbá, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.311-316, 2008.

McDOLE M.G.; GAY J.M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.3, p.257-260, 2002.

OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C.; DE OLIVEIRA, J.M.; MONTEIRO, L.A.R.C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.133–138, 2007.

PARÉ, J.; FECTEU, 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.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dog and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001.

PITEL, P. H.; ROMAND, S.; PRONOST, S.; FOUCHER, N.; GARGALA, G.; MAILLARD, K.; THULLIEZ, P.; COLLOBERT-LAUGIER, C.; TAINTURIER, D.; FORTIER, G.; BALLEST, J. J. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.1-6, 2003.

PLUGGE, N. F.; FERREIRA, F. M.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DE SIQUEIRA, A.; DITTRICH, R. L. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 202-206, 2011.

PUSTERLA, N.; CONRAD, P.; PACKHAM, A.; MAPES, S.; FINNO, C.; GARDNER, I.; BARR, B.; FERRARO, G.; WILSON, W. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 281-285, 2011.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. **Manual of Equine Practice**. Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 316 – 317, 1993.

SÁNCHEZ, G.F.; MORALES, S.E.; MARTÍNEZ, M.J.; TRIGO, J.F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.

SANGIONI, L. A.; BOTTON, S.A.; CARGNELUTTI, J. F.; CADORE, G.C.; SKREBSKY, A.; WEIBLEN, R.; ANJOS LOPES, S. T.; VOGEL, F.S.F. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpesvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 321-323, 2011.

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

STELMANN, U.J.P.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M. Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em equinos com histórico de ataxia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.4, p.200-202, 2011.

SPÓSITO FILHA, E.; AMARAL, V.; MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M.M.; SANTOS, S.M.; BORG, F. Infecção experimental de equinos com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.1, p.51-54, 1992.

TOSCAN, G.; CADORE, G.C.; PEREIRA, R.C.F.; SILVA, G.B.; CEZAR, A.S., SANGIONI, L.A.; DE OLIVEIRA, L.S.S.; VOGEL, F.S.F. Equine neosporosis: occurrence of antibodies against *Neospora* spp. and association between the serological status of the mares and of their offspring. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.641–645, 2010.

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

VARDELEON, D.; MARSH, A.E.; THORNE, J.G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p.273–282, 2001.

VERONESI, F.; DIAFERIA, M.; MANDARA, M.T.; MARENZONI, M.L.; CITTADINI, F.; PIERGILI FIORETTI, D. *Neospora* spp. infection associated with equine abortion and/or stillbirth rate. **Veterinary Research Communications**, v.32, p.223-226, 2008.

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

VILLALOBOS, E.M.C.; UENO, T.E.H.; SOUZA, S.L.P.; CUNHA, E.M.S.; LARA, 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.

VILLALOBOS, E.M.C.; FURMAN, K.E.; LARA, M.C.C.S.H.; CUNHA, E.M.S.; FINGER, M.A.; BRUSCH, A.P.B.; FILHO, I.R.B.; DECONTO, I.; DORNBUSCH, P.T.; BIONDO, A.W. Detection of *Neospora* sp. antibodies in cart horses from urban áreas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.21, n.1, p.68-70, 2012.

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

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

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

ANEXO 1

PROTOCOLO: Preparo das Lâminas de IFI para pesquisa de anticorpos contra *Neospora* sp. e *T. gondii*

As lâminas de IFI foram preparadas com taquizoítas da cepa NC-1 (cepa referência) de *N. caninum* e da cepa RH de *T. gondii* obtidos do cultivo *in vitro* e fixados nas lâminas de IFI de acordo com o protocolo a seguir:

1. Retirar o meio de cultivo das garrafas infectadas com os taquizoítas. Lavar a monocamada com PBS.
2. Remover a monocamada de células com uma haste de borracha, ou com 1,0 ml de tripsina. Os taquizoítas podem ser retirados com menor número de células, sem a remoção completa do tapete celular.
3. Transferir a suspensão para um tubo de Falcon. Passar a suspensão em agulha (25x6) e seringa, três vezes, para romper as células. A filtração com filtro de 5 µm pode ser usada para remover os restos celulares.
4. Centrifugar a suspensão por 10 minutos, a 163 g, na temperatura de 6°C.
5. Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento com 1,0 ml de PBS.
6. Contar os protozoários em câmara de Neubauer.
7. Número de taquizoítas/ml = (número médio de taquizoítas/quadrado grande da câmara) x (10^4) x (fator de diluição).
8. Centrifugar por 10 minutos, a 163 g, na temperatura de 6°C. Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem com PBS e centrifugar novamente.
9. Diluir o inóculo com PBS (pH 7,2) para uma quantidade de $1,0 \times 10^6$ taquizoítas/ml.
10. Limpar as lâminas previamente com álcool etílico 70%.
11. Depositar 20 µl da suspensão em cada orifício da lâmina de IFI.
12. Secar as lâminas na estufa a 37°C, ou em temperatura ambiente.
13. Manter as lâminas a -20°C. O prazo de utilização é de 6 meses.

ANEXO 2

PROTOCOLO: Reação de Imunofluorescência Indireta

1. Cada lâmina de imunofluorescência, previamente sensibilizada com taquizoítas de *N. caninum*/*T. gondii* era identificada na parte polida. Soros controles positivo e negativo eram incluídos, além dos soros testes.
2. Anotar todas as amostras em protocolo controle;
3. Diluir as amostras de soro com PBS (pH 7,2);
4. Retirar as lâminas do congelador;
5. Secar sob ventilação, por 10 minutos;
6. Colocar 25µl de cada amostra de soro diluído nos orifícios (poço) da lâmina;
7. Incubar as lâminas por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida;
8. Lavar com PBS, por 10 minutos, nas cubas;
9. Lavar com água destilada;
10. Secar;
11. Colocar o conjugado específico (25µl/poço);
12. Incubar as lâminas por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida;
13. Lavar com PBS, por 10 minutos, nas cubas;
14. Lavar com água destilada, por 5 minutos;
15. Secar;
16. Colocar glicerina 90% (tamponada com PBS), entre as duas fileiras de orifícios e colocar uma lamínula;
17. Examinar as lâminas no microscópio de imunofluorescência.

CAPÍTULO II

INVESTIGAÇÃO DE *Neospora* sp. e *Toxoplasma gondii* NO SÊMEN DE REPRODUTORES EQUINOS ATRAVÉS DO CULTIVO CELULAR E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

RESUMO

O garanhão pode ser um portador assintomático de agentes patogênicos que causam perdas reprodutivas em éguas. Bactérias, vírus e protozoários podem ser disseminados pelo sêmen. A neosporose e a toxoplasmose estão entre as doenças que podem ocasionar problemas reprodutivos em éguas, causadas por protozoários, que ainda não foram identificados no sêmen de equinos. Em bovinos, a presença de DNA de *N. caninum* no sêmen já foi relatada, sugerindo a possibilidade da transmissão venérea nesta espécie. A ocorrência de *T. gondii* foi demonstrada no sêmen de humanos, bovinos, suínos, caninos, caprinos e ovinos infectados, alertando sobre outras possíveis formas de transmissão do parasito. O presente estudo teve por objetivos verificar a presença dos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen de reprodutores equinos, provenientes de propriedades com histórico de falhas reprodutivas e éguas soropositivas para *Neospora* sp. e *T. gondii*, através da inoculação do sêmen em cultivo celular e da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados oito garanhões, das raças Crioula e Mangalarga Marchador, clinicamente saudáveis, provenientes de três propriedades, localizadas nos estados do Paraná e de Santa Catarina. Todos estavam em atividade sexual e foram submetidos à colheita de sangue para análise sorológica frente aos protozoários *N. caninum* (NC-1) e *T. gondii* (RH), na diluição 1:50. A colheita de sêmen foi realizada através da vagina artificial, um ejaculado de cada animal foi colhido e filtrado com filtro de *nylon*. No laboratório, os ejaculados foram centrifugados (4000 g por 10 minutos) e o *pellet*, porção contendo os espermatozoides foi recuperada, sendo uma parte inoculada no cultivo celular com células Vero, e a restante mantida a -20°C até o momento da extração de DNA, realizada pelo método de fenol-clorofórmio. As amostras obtidas do cultivo celular do sêmen e do sêmen *in natura* foram submetidas à amplificação por PCR, utilizando iniciadores que delimitam o segmento de DNA da região Nc5 de *Neospora caninum* (Np6/Np21), da região ITS1 (ITS2/ITS5) e da região 18S (FE/RE; FE/RI), para verificar a presença de DNA de *T. gondii*, *S. neurona*, e/ou *N. caninum*. Todos os garanhões foram soronegativos para ambos parasitas. Não foi verificado o crescimento de protozoários no cultivo celular do sêmen. Apenas para a região 18S ocorreu amplificação de DNA das amostras obtidas do cultivo celular do sêmen e do sêmen *in natura*. As amostras foram sequenciadas e as sequências do cultivo celular do sêmen foram compatíveis com *Acanthamoeba rhyodes* e *A. castellanii* e as do sêmen *in natura* com espécies de plantas, revelando pouca especificidade dos *primers* utilizados para região 18S. Os protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* não foram encontrados no sêmen dos reprodutores avaliados, porém esse resultado não permite excluir a possibilidade da transmissão venérea desses protozoários na espécie equina. Os protozoários encontrados neste estudo podem ser provenientes do ambiente ou estarem presentes no prepúcio, contaminando o sêmen. A presença destes agentes e suas consequências na reprodução em equinos até hoje é desconhecida.

Palavras- chave: *Neospora* sp. *Toxoplasma gondii*. PCR. Sêmen. Equinos.

ABSTRACT

The stallion can be an asymptomatic carrier of diseases causing reproductive losses in mares. Bacteria, viruses and protozoa can be spread through semen. The neosporosis and toxoplasmosis are the diseases that can cause reproductive problems in mares caused by protozoa, which have not yet been identified in equine semen. In cattle, the presence of *Neospora caninum* DNA in semen have been reported, suggesting the possibility of venereal transmission. The occurrence of *Toxoplasma gondii* was demonstrated in the semen of humans, cattle, pigs, dogs, goats and sheep infected, alerting other possible forms of parasite transmission. The present study aimed to verify the presence of protozoa *Neospora* sp. and *T. gondii* in semen samples from breeding horses, from properties with a history of reproductive failure and mares seropositive for *Neospora* sp. and *T. gondii* through the inoculation of semen in cell culture and polymerase chain reaction (PCR). It was used eight stallions, from races Crioula and Mangalarga Marchador, clinically healthy and from three properties, located in the states of Paraná and Santa Catarina. All were in sexual activity and were submitted to blood collection for serological analysis to *N. caninum* (NC-1) and *T. gondii* (RH), at 1:50 dilution. The semen collection was performed using the artificial vagina, one ejaculate of each animal was collected and filtered with nylon filter. In the laboratory, the ejaculates were centrifuged (4000 g for 10 minutes) and the pellet, portion containing the sperm was recovered, and one part inoculated in cell culture with Vero cells, and the rest kept at -20 °C until the DNA extraction, performed by phenol-chloroform method. The samples obtained from cell cultures of semen and semen in natura were subjected to PCR amplification using primers that define the DNA segment Nc5 the region of *N. caninum* (Np6/Np21), ITS1 (ITS2/ITS5) and 18S region (FE/RE, FE/RI), to evaluate the presence of DNA from *T. gondii*, *S. neurona*, and/or *N. caninum*. All the stallions were seronegative for both parasites. The protozoan was not detected in cell culture of the semen samples. Only for the 18S region DNA was amplified from samples obtained from cell cultures of semen and from semen in natura. The samples were sequenced and the sequences obtained from cell cultures of semen were compatible with *Acanthamoeba rhyodes* and *A. castellanii* and from semen in natura, with plant species, revealing little specificity of the primers used for 18S region. The protozoa *Neospora* sp. and *T. gondii* were not found in the semen of the stallions evaluated but this result does not exclude the possibility of venereal transmission of these parasites in equine species. The protozoa found in this study may come from the environment or be present on the prepuce, contaminating the semen. The presence of these agents and their effects on reproduction in horses is unknown until today.

Keywords: *Neospora* sp. *Toxoplasma gondii*. PCR. Semen. Horses.

1 INTRODUÇÃO

O garanhão é um importante fator de risco epidemiológico na disseminação de bactérias, vírus e protozoários pelo sêmen, visto que a localização geográfica deixou de ser barreira na transmissão de doenças (METCALF, 2000). Através da inseminação artificial, um único garanhão pode ser usado com mais de 300 éguas por ano (SAMPER *et al.*, 2006). E por ser um portador assintomático de doenças que causam perdas reprodutivas, pode contaminar muitas éguas, principalmente quando é utilizada a cobertura natural (PARLEVLIET *et al.*, 2000; SAMPER *et al.*, 2006).

O pênis e o prepúcio do garanhão são colonizados por uma grande variedade de bactérias comensais e/ou bactérias potencialmente patogênicas que podem contaminar o sêmen durante a ejaculação (CORONA *et al.*, 2009). Bactérias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus zooepidemicus* e *Taylorella equigenitalis* podem ser transmitidas pelo sêmen e podem causar endometrite e infertilidade em éguas susceptíveis (METCALF *et al.*, 2001; SAMPER *et al.*, 2006).

Os vírus conhecidos transmitidos pelo sêmen equino e que podem causar problemas reprodutivos em éguas são: vírus da arterite equina (WOOD *et al.*, 1995; TIMONEY *et al.*, 2000), herpes vírus equino tipo 1 (CARVALHO *et al.*, 2000; HEBBIA-FELLAH *et al.*, 2009) e vírus da anemia infecciosa equina (WOOD *et al.*, 2007). O herpes vírus tipo 1 já foi encontrado no testículo, epidídimo e glândulas acessórias anexas de garanhões naturalmente e experimentalmente infectados (HODDER *et al.*, 2007). O herpes vírus equino tipo 3 responsável pelo exantema coital pode ser transmitido por via venérea, porém não está associado com problemas reprodutivos (METCALF, 2001; BARRANDEGUY *et al.*, 2012).

Em equinos, *Trypanossoma equiperdum* é o principal protozoário conhecido transmitido por via venérea, sendo sua ocorrência descrita na África, América Central, América do Sul e Oriente Médio (COUTO; HUGHES, 1993; METCALF, 2001). A piroplasmose, causada pelos protozoários *Babesia equi* e *Babesia caballi*, tem recebido mais atenção nos últimos tempos devido à movimentação de cavalos provenientes de áreas endêmicas, localizadas principalmente no sul dos Estados

Unidos. A transmissão ocorre através do carrapato, mas a transmissão mecânica tem sido relatada, e existe uma preocupação sobre a possibilidade da transmissão venérea, se o sangue de um animal infectado contaminar o sêmen (METCALF, 2001; SAMPER *et al.*, 2006). Outros protozoários responsáveis por problemas reprodutivos em éguas como *Neospora* sp. e *T. gondii* ainda não foram detectados no sêmen de equinos.

Em bovinos, a presença de DNA de *N. caninum* no sêmen já foi relatada (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; FERRE *et al.*, 2008). Serrano *et al.* (2006) sugerem que a transmissão horizontal, através do sêmen, é possível em bovinos. O estágio infeccioso excretado no sêmen acredita-se ser de taquizoítas, pois são encontrados em vários tipos celulares e tecidos (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003).

A ocorrência de formas infectantes, taquizoítas de *T. gondii* foi demonstrada no sêmen de humanos (MARTINEZ-GARCIA *et al.*, 1996), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009), suínos (MOURA *et al.* 2007), caninos (ARANTES *et al.*, 2009), caprinos (MORAES *et al.*, 2010; SANTANA *et al.*, 2010) e ovinos (LOPES *et al.*, 2009) infectados, alertando sobre outras possíveis formas de transmissão do parasito uma vez que se desconhece a importância relativa da via venérea.

Diferente da maioria das bactérias que são mais facilmente isoladas por métodos convencionais, detectar um parasita intracelular, no caso do *Neospora* sp., torna-se mais difícil (LEON *et al.*, 2011). Técnicas de biologia molecular têm sido amplamente aplicadas, tanto no diagnóstico de doenças infecciosas como parasitárias (YANG *et al.*, 2004) e fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos (MARQUES *et al.*, 2002).

A revolucionária técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) reproduz *in vitro* a replicação da molécula de DNA em grande escala e, de todas as técnicas moleculares, esta é considerada a mais desenvolvida (WENG *et al.*, 2006, YANG *et al.*, 2004). Vários tipos de PCR têm sido desenvolvidos, visando à região ITS1 e a sequência específica Nc5 do *N. caninum*, como a *nested* ou *hemi-nested* PCR, melhorando a sensibilidade e a especificidade (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2002; CABRAL *et al.*, 2009).

Considerando-se os fatores como a ocorrência de abortos em éguas e a escassez de informações sobre a transmissão venérea de protozoários, como *Neospora* sp. e *T. gondii* em equinos; e, a possibilidade destes parasitas estarem presentes no sêmen desta espécie como encontrado em bovinos. Os objetivos deste estudo foram verificar a presença dos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen de reprodutores equinos, provenientes de propriedades com histórico de falhas reprodutivas e éguas soropositivas para *Neospora* sp. e *T. gondii*. A investigação de protozoários foi realizada através da inoculação do sêmen em cultivo celular e da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E ÁREA GEOGRÁFICA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram avaliados oito garanhões das raças Crioula e Mangalarga Marchador, sendo sete comprovadamente férteis e um garanhão jovem, que havia iniciado na reprodução no ano de 2011. Todos reprodutores estavam em atividade sexual e apresentavam-se clinicamente saudáveis, as idades variaram entre 3 e 18 anos. Todos os animais foram submetidos à colheita de sangue e de sêmen.

Os garanhões eram utilizados tanto para monta natural quanto para inseminação artificial. A propriedade 1 durante a estação de monta recebia éguas de outras propriedades para serem inseminadas. E nessa propriedade, o reprodutor 3 apresentava outros proprietários, sendo transferido durante a estação de monta para outras propriedades. Os garanhões da propriedade 3 também eram utilizados através da monta natural ou inseminação artificial em éguas de outras propriedades.

Os reprodutores equinos eram provenientes de três propriedades (tabela 1) que apresentavam histórico de falhas reprodutivas e éguas soropositivas para *Neospora* sp. (todas propriedades) e para *T. gondii* (apenas propriedade 2). As

propriedades eram localizadas nas seguintes regiões: uma na região Metropolitana de Curitiba, uma na região Centro-Oriental do Paraná e uma no Norte de Santa Catarina (figuras 1 e 2). As identificações dos garanhões e das raças dos animais encontram-se na tabela 2.

TABELA 1- LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES AVALIADAS

PROPRIEDADE	LOCALIZAÇÃO (ESTADO)	LATITUDE	LONGITUDE
1	Centro-Oriental (PR)	25°38'74" S	50°00'01" W
2	Metropolitana de Curitiba (PR)	25°75'53" S	49°72'54" W
3	Norte (SC)	26°11'84" S	50°39'15" W



FIGURA 1 – MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

FONTE: <http://www.o-parana.net/diretorio/>



FIGURA 2 – MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA COM A LOCALIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

FONTE: <http://pt.wikipedia.org/>

TABELA 2- IDENTIFICAÇÃO DOS REPRODUTORES EQUINOS AVALIADOS E DAS RAÇAS DOS ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO/ GARANHÃO	PROPRIEDADE	RAÇA
REP 01	1	Crioula
REP 02	1	Crioula
REP 03	1	Crioula
REP 04	1	Crioula
REP 05	2	Mangalarga Marchador
REP 06	2	Mangalarga Marchador
REP 07	3	Crioula
REP 08	3	Crioula

2.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

A colheita das amostras sanguíneas foi realizada para análise sorológica frente aos protozoários *N. caninum* (NC-1) e *T. gondii* (RH).

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular em tubos sem anticoagulante, dos oito reprodutores equinos. Foram centrifugadas a 4.000 g

por 5 minutos, separadas em alíquotas e congeladas a -20° C, para a sua conservação e manutenção, até o momento da análise sorológica.

2.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI

A reação de imunofluorescência indireta foi empregada para pesquisa de anticorpos contra *Neospora* sp. e *T. gondii* nas amostras de soro dos reprodutores equinos. A técnica de IFI encontra-se descrita no capítulo I. O ponto de corte adotado nesse estudo foi o mesmo para *Neospora* sp. e *T. gondii* (1:50) para todas as amostras.

2.4 COLHEITA DE SÊMEN

Foram analisados oito ejaculados de oito garanhões. Previamente às colheitas de sêmen foram realizadas higienizações do pênis dos garanhões com água morna pura, com o objetivo de remover sujidades diversas.

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Hannover. Além do tubo de látex flexível, foi utilizado um segundo tubo interno de plástico descartável, lubrificado com vaselina e copo coletor plástico esterilizado. A temperatura interna da vagina artificial ficava entre 42°C e 44°C. Para a colheita de sêmen utilizou-se uma égua em cio e devidamente contida com peias e com a cauda protegida. Imediatamente após a colheita, o sêmen foi filtrado, utilizando um filtro de *nylon* (Minitube®) separando a fração rica de espermatozóides da fração gelatinosa. Os ejaculados foram armazenados em tubos tipo Falcon previamente esterilizados e mantidos a 4°C até serem encaminhados para o laboratório.

Em seguida o sêmen foi submetido ao processo de centrifugação (4000 g, durante 10 minutos), sendo separado os espermatozóides do plasma seminal

(sobrenadante), e o *pellet*, porção contendo os espermatozóides foi recuperada, sendo uma parte inoculada no cultivo celular e a restante mantida a -20°C até o momento da extração de DNA.

2.5 PESQUISA DE PROTOZOÁRIOS NO SÊMEN EQUINO

2.5.1 Cultivo celular

O cultivo de células foi realizado no laboratório de Patologia Clínica do HV da UFPR. Foi utilizado linhagem de células pré-estabelecidas, denominadas Vero (células de rim de macaco verde africano), as quais foram utilizadas para manter as cepas dos protozoários *N. caninum* (cepa NC-1) e *T. gondii* (cepa RH) e também para inoculação das amostras de sêmen.

As células Vero utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti – Secretaria da Agricultura e Pecuária do Paraná – SEAB.

As células Vero foram cultivadas em 5 mL de meio de crescimento Eagle, Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), em frascos de cultivo celular de poliestireno, de 25 cm² e mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C. O meio de Eagle foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de caldo triptose fosfato (TPB), 100 UI/mL de penicilina G potássica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,25 µg/mL de anfotericina B. As trocas de meio foram realizadas periodicamente.

As garrafas com células Vero foram observadas em microscópio ótico invertido para avaliação do crescimento celular, bem como a adesão das células e formação de monocamada, e para avaliações das etapas do cultivo e subcultivos. Os subcultivos foram realizados em cabine de fluxo laminar, através da transferência de células de uma garrafa de cultivo para outras garrafas, utilizando tripsina para remover as células aderentes dos frascos, identificando na garrafa o número da sequência de passagens (relativos ao número de subcultivos).

2.5.1.1 Cultivo das cepas de *N. caninum* (NC-1) e de *T. gondii* (RH)

As cepas de referência utilizadas NC-1 de *N. caninum*, foi cedida pela Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich, proveniente do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade de Madison-Wisconsin, EUA, e a cepa RH de *T. gondii*, cedida pelas Professoras Dra. Vanete Thomaz Soccol e Dra. Edilene Alcântara de Castro, proveniente do CDME, ambas foram produzidas *in vitro* no laboratório de Patologia Clínica do HV da UFPR.

Os frascos de cultivo com monocamadas de células Vero de 24 horas foram utilizados para inocular as cepas NC-1 de *N. caninum* e RH de *T. gondii*. O meio de Eagle (MEM) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de caldo triptose fosfato (TPB), 100 UI/mL de penicilina G potássica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,25 µg/mL de anfotericina B. Os frascos de cultivo celular foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e em temperatura de 37°C.

O cultivo das cepas dos protozoários era observado diariamente em um microscópio invertido, com o objetivo de avaliar a multiplicação dos parasitas *in vitro*, e os efeitos citopáticos causados na monocamada, a presença e o comportamento das cepas nas células.

O meio foi substituído duas a três vezes por semana e os parasitas foram transferidos periodicamente para novos frascos, conforme o crescimento. Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar linear vertical, de maneira asséptica.

A finalidade do cultivo das cepas de *N. caninum* e *T. gondii* era a obtenção de sedimento parasitário para a extração de DNA e realização da PCR. Os produtos de amplificação obtidos com o DNA das duas cepas foram utilizados como controles positivos da PCR.

2.5.1.2 Cultivo celular das amostras de sêmen

Após a centrifugação das amostras de sêmen (4.000 g, 10 minutos), o *pellet*, porção contendo os espermatozóides, foi recuperada e ressuspensa em meio Eagle, novamente centrifugada e recuperada, para remover o máximo possível do plasma seminal. Depois 1,0 mL foi inoculado no cultivo de células Vero de 24 horas. O meio de Eagle (MEM) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de caldo triptose fosfato (TPB), 100 UI/mL de penicilina G potássica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,25 µg/mL de anfotericina B. Os frascos de cultivo celular foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e em temperatura de 37°C.

O cultivo das amostras de sêmen era observado diariamente em um microscópio invertido, com o objetivo de avaliar a possibilidade de isolamento de protozoários, além de possíveis efeitos citopáticos causados na monocamada e avaliar a ocorrência de contaminação das amostras.

O meio foi substituído duas a três vezes por semana. O cultivo celular foi mantido durante 60 dias, período considerado para o crescimento de *Neospora* em células Vero.

2.5.2 Extração do DNA

A extração do DNA, assim como as etapas posteriores, com exceção do sequenciamento foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

As amostras obtidas do cultivo celular do sêmen e do sêmen *in natura* dos equinos foram submetidas à extração e purificação de DNA pelo método de fenol-clorofórmio, segundo metodologia preconizada por Sambrook e Russell (2001).

Nas amostras provenientes do cultivo celular do sêmen e nos controles positivos de *N. caninum* e *T. gondii*, a manutenção dos parasitas foi feita através de

passagens sucessivas em frascos de cultivo, para obtenção de 50 a 100 mg de sedimento de parasitas, para extração do seu DNA (Anexo 1).

O sêmen *in natura* de cada animal foi centrifugado para remoção do plasma seminal e foi armazenada em tubos Eppendorf a -20° C até a extração do DNA (Anexo 2).

As amostras de DNA foram mantidas a -20°C, por no mínimo uma noite, para em seguida serem quantificadas. A quantificação do DNA foi realizada por meio de espectrofotometria no aparelho Nanodrop 2000, da Thermo Scientific. As concentrações de DNA foram determinadas nas absorbâncias de 260nm e 280nm. Das amostras estoque de DNA, com as concentrações em ng/μL, foram preparadas soluções de uso, nas concentrações de 50 e 100 ng/ μL.

Após a extração e determinação das concentrações do DNA de todas as amostras, realizou-se a PCR.

2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para a pesquisa de protozoário nas amostras de sêmen de equinos, tanto do cultivo celular quanto do sêmen *in natura*.

As amostras de DNA obtidas no item acima foram submetidas à amplificação por PCR utilizando-se diferentes formatos e *primers*. Para tanto, foram utilizados iniciadores que delimitam o segmento de DNA da região Nc5 de *N. caninum* (YAMAGE *et al.*, 1996), da região ITS1 (WHITE *et al.*, 1990) e da região 18S (MILLER *et al.*, 2009).

2.5.3.1 Região Nc5 de *N. caninum*

Essa região é específica para *N. caninum* e não foi encontrada no genoma de *T. gondii*, *Sarcocystis capracanis*, *S. cruzi*, *S. miescheliana*, *S. moulei*, *S. tenella* e

Hammondia hammondi (YAMAGE *et al.*, 1996; BASZLER *et al.*, 1999; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003). Os pares de *primers* utilizados foram Np6/Np21 (tabela 3), específicos para *N. caninum* (YAMAGE *et al.*, 1996). Os componentes da solução de amplificação utilizada encontram-se na tabela 4.

TABELA 3- CARACTERÍSTICAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA PCR PARA PESQUISA DE *N. caninum*

PRIMER	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA (5'-3')	SENTIDO	POSIÇÃO*
Np6	CAGTCAACCTACGTCTTCT	Anti-senso	758-776
Np21	GTGCGTCCAATCCTGTAAC	Senso	449-467

C – citosina; T – timina; A – adenina; G – guanina * Posição do primer na sequência do DNA de *N. caninum*

TABELA 4- COMPONENTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *N. caninum* E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM UMA REAÇÃO COM OS *PRIMERS* Np6/Np21

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME NA REAÇÃO
Água Mili-Q	-	-	18,25 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,5 µL
Triton- 100x	10%	0,1%	0,25 µL
Np6	20 µM	0,2 µM	0,25 µL
Np21	20 µM	0,2 µM	0,25 µL
Taq polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,25 µL
DNA	-	-	2 µL
Total	-----	-----	25 µL

Para a realização da técnica da PCR foi utilizado protocolo adotado por Locatelli-Dittrich *et al.* (2003) com algumas modificações. As medidas para evitar contaminação das amostras, dos reagentes e equipamentos foram adotadas. Antes do preparo da solução de amplificação, o fluxo laminar foi previamente desinfetado com álcool 70% e a lâmpada UV foi mantida ligada por 15 minutos. Os reagentes utilizados foram previamente distribuídos em alíquotas e as micropipetas utilizadas eram separadas para amplificação (pré-PCR) e manipulação dos produtos (pós-PCR). A solução de amplificação, contendo a mistura dos componentes, foi

distribuída em alíquotas nos tubos de PCR, previamente esterilizados, e transportados em gelo para outra sala onde foi adicionado o DNA.

Após a adição do DNA as amostras foram homogeneizadas individualmente e colocadas no termociclador (“Veriti Thermal Cycler - Applied Biosystems”), que foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para a hibridização e 45 segundos a 72°C para a extensão do DNA complementar. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras. Foram utilizados na reação de amplificação amostra contendo DNA de *N. caninum* (cepa referência NC-1) e amostra sem DNA (água ultrapura) para atuarem como controles positivo e negativo respectivamente.

2.5.3.2 Região ITS1

A região ITS (“internal transcribed spacer”) está localizada entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (HILLIS; DIXON, 1991). O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (HILLIS; DIXON, 1991; SCHLOTTERER *et al.*, 1994). Enquanto as regiões dos genes ribossomais, são altamente conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento (GERBI, 1985), sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros (HOMAN *et al.*, 1997; MARSH *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004).

A análise da sequência de nucleotídeos da região ITS1 constitui uma importante ferramenta para definição de isolados de um determinado organismo e diferenciação entre parasitos estreitamente relacionados (MARSH *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2001; GONDIM *et al.*, 2004).

Para obtenção da amplificação de DNA da região ITS1 foram utilizados os iniciadores ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e ITS2

5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3' (WHITE *et al.*, 1990). Os diferentes organismos pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae possuem sequências de nucleotídeos diferentes na região codificadora do ITS1, de forma que a análise deste locus permite distinguir estes organismos. Os componentes da solução de amplificação utilizada encontram-se na tabela 5.

TABELA 5- COMPONENTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS-1 E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM UMA REAÇÃO COM OS PRIMERS ITS2/ITS5

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME NA REAÇÃO
Água Mili-Q	-	-	17,10 µL
Tampão	10 X	1 X	2,5 µL
MgCl ₂	50 mM	2,0 mM	1,00 µL
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,5 µL
Triton- 100x	10%	0,1%	0,25 µL
ITS5	20 µM	0,5 µM	0,625 µL
ITS2	20 µM	0,5 µM	0,625 µL
Taq polimerase	5 U/µL	2,0 U	0,40 µL
DNA	-	-	2 µL
Total	-----	-----	25 µL

Os mesmos cuidados no preparo da solução de amplificação anteriormente descritos foram devidamente respeitados, com o objetivo de evitar contaminações com amplicons.

Após a adição do DNA as amostras foram homogeneizadas individualmente e colocadas no termociclador que foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 20 segundos para desnaturação, 52°C por 45 segundos para a hibridização e 45 segundos a 72°C para a extensão do DNA complementar. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras. Em cada reação de amplificação foram utilizados como controles positivos, amostra contendo DNA de *N. caninum* (cepa referência NC-1) e amostra contendo DNA de *T. gondii* (cepa referência RH), e como controle negativo, amostra sem DNA (água ultrapura).

2.5.3.3 Região 18S

Foi realizada uma *hemi-nested* PCR, visando à região 18S rDNA, para verificar a presença de DNA de *T. gondii*, *S. neurona*, e/ou *N. caninum*. Os *primers* utilizados foram 18S *Forward External* (FE), GCAAGGAAGTTTGAGGCAAT, 18S *Reverse External* (RE), TGCAGGTTACCTACGGAAA e 18S *Reverse Internal* (RI), TCCTTCCTCTAAGTGTTAAGGTTCA (MILLER *et al.*, 2009). Uma primeira amplificação foi realizada com os *primers* externos 18S FE e RE e utilizando 2 µL do produto dessa primeira PCR, uma segunda amplificação foi realizada com os *primers* internos 18S FE e RI. Os componentes da solução de amplificação utilizada encontram-se na tabela 6.

TABELA 6- COMPONENTES DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM UMA REAÇÃO COM OS *PRIMERS* FE/RE E FE/RI

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME NA REAÇÃO
Água Mili-Q	-	-	15,45 µL
Tampão	10 X	1 X	2,45 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,5 µL
FE	20 µM	0,2 µM	0,25 µL
RE/RI	20 µM	0,2 µM	0,25 µL
Taq polimerase	5 U/µL	1,5 U	0,30 µL
DNA	-	-	2 µL
Total	-----	-----	25 µL

As condições tanto para a primeira quanto para a segunda PCR foram uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo por uma temperatura de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 47°C por 30 segundos para a hibridização e 45 segundos a 72°C para a extensão do DNA complementar. Na última etapa foi programado um ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras. Em cada reação de amplificação foram utilizados como controles positivos, amostra

contendo DNA de *N. caninum* (cepa referência NC-1) e amostra contendo DNA de *T. gondii* (cepa referência RH), e como controle negativo, amostra sem DNA (água ultrapura).

2.5.4 Identificação dos produtos da PCR

Os produtos amplificados pelas PCRs mais o marcador de peso molecular de 1 Kb (“Invitrogen DNA Ladder”) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M; EDTA 2 mM), à 80 V. Em cada orifício do gel foram depositados 5 µL de cada amostra misturado a 2 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 minutos, depois lavado em água destilada por 8 minutos e, posteriormente, visualizado em transiluminador L-PIX HE (Loccus Biotecnologia®) com luz UV e fotodocumentado.

2.5.5 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos da PCR empregando-se os *primers* FE/RE/RI foram submetidos à purificação para remoção de dNTPs e *primers* não incorporados na reação, bem como o DNA da amostra que não foi amplificado, através de acetato de amônio, etanol absoluto e etanol 70%. O protocolo utilizado encontra-se no anexo 3. Foi realizada eletroforese em gel de agarose após a purificação dos produtos amplificados para confirmar a existência de apenas um fragmento amplificado em cada amostra.

2.5.6 Sequenciamento

Após a purificação dos produtos amplificados, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento, realizado na empresa Ludwig Biotec®, com o sequenciador “Applied Biosystems ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer”. Conforme a recomendação da empresa em um tubo de 500 µL foram adicionados 3 µL de DNA purificado e 4,5 pmol do primer R (RI) e em outro tubo de 500 µL foram adicionados 3 µL de DNA purificado e 4,5 pmol do primer F (FE), as amostras e os primers utilizados foram identificados. As amostras foram enviadas secas.

2.5.7 Análise das sequências

As sequências nucleotídicas obtidas pela amplificação e sequenciamento foram alinhadas e comparadas a dados presentes no “GenBank”. Para comparações das sequências obtidas foi utilizado o programa “BLAST” disponível no site da NCBI (“National Center for Biotechnology Information”).

3 RESULTADOS

3.1 SOROPREVALÊNCIA DE *Neospora* sp. E *T. gondii* NOS REPRODUTORES EQUINOS

Todas as amostras de soros dos equinos foram negativas para os protozoários *Neospora* sp. e *T.gondii* na diluição 1:50 na RIFI.

3.2 CULTIVO DAS CEPAS DE *N. caninum* (NC-1) E *T. gondii* (RH)

A monocamada de células Vero dos frascos de cultivo contendo os parasitas, foi observada periodicamente, quanto a sua integridade, presença dos efeitos citopáticos, o grau de infecção, e a presença de protozoários livres no meio. Com a destruição de 80% da monocamada de células foi realizada a transferência dos parasitas para novos frascos de cultivo, contendo células Vero de 24 horas. Após a remoção dos parasitas dos frascos de cultivo, a suspensão foi submetida a três sucessivas passagens por agulha (25 x 6) e seringa, para romper as células Vero e liberar um maior número de taquizoítas no meio.

3.3 CULTIVO CELULAR DAS AMOSTRAS DE SÊMEN

No cultivo celular das amostras de sêmen não foi verificado o crescimento de protozoários, mesmo assim as amostras obtidas do cultivo celular foram verificadas para a presença de DNA de *N. caninum* e *T. gondii*, através da reação em cadeia da polimerase.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE - PCR

As amostras testadas tanto do sêmen *in natura* quanto do cultivo celular apresentaram resultados negativos na amplificação das regiões Nc5 e ITS1, não possibilitando a realização do sequenciamento dos produtos da PCR (Figuras 3 e 4). Para a região 18S, verificou-se a presença de bandas tanto em amostras do cultivo (Figura 5), que não apresentaram crescimento, como em todas as amostras do sêmen (Figura 6). O sequenciamento das amostras positivas foi realizado, porém as sequências obtidas não foram compatíveis com os protozoários *N. caninum*, *T. gondii* ou *S. neurona*.

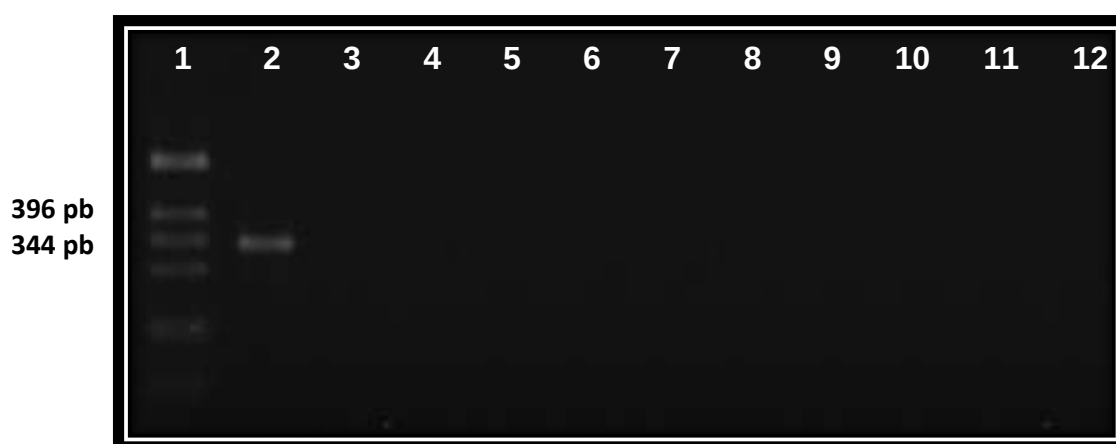


FIGURA 3 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO Nc5 DE *N. caninum* UTILIZANDO OS INICIADORES Np6 E Np21. (1) MARCADOR MOLECULAR 1 KB (INVITROGEN); (2) CEPA DE REFERÊNCIA NC-1 DE *N. caninum* – CONTROLE POSITIVO; (3) CONTROLE NEGATIVO; (4), (5), (6), (7) E (8) AMOSTRAS NEGATIVAS DO SÊMEN *IN NATURA*; (9), (10) E (11) E (12) AMOSTRAS NEGATIVAS OBTIDAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN. TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO: 344 PB.

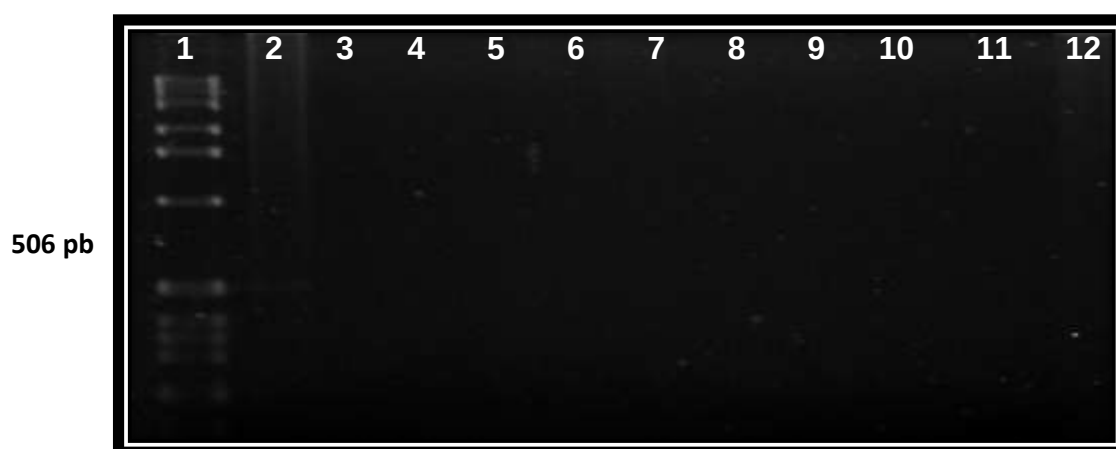


FIGURA 4 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1 UTILIZANDO OS INICIADORES ITS2 E ITS5. (1) MARCADOR MOLECULAR 1 KB (INVITROGEN); (2) CEPA DE REFERÊNCIA NC-1 DE *N. caninum* – CONTROLE POSITIVO; (3) CONTROLE NEGATIVO; (4), (5), (6), (7) E (8) AMOSTRAS NEGATIVAS DO SÊMEN *IN NATURA*; (9), (10), (11) E (12) AMOSTRAS NEGATIVAS OBTIDAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN. TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO: 506 PB.

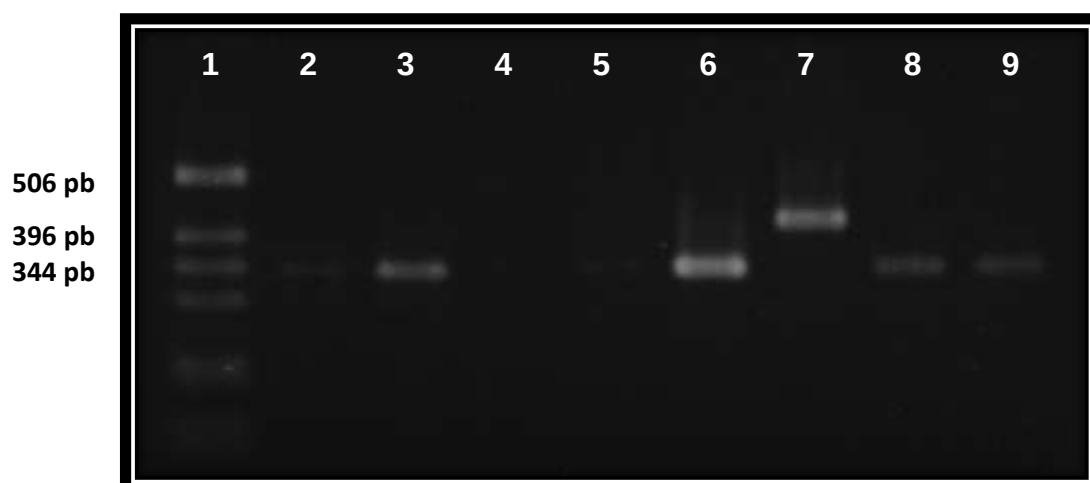


FIGURA 5 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S UTILIZANDO OS INICIADORES FE/RE E FE/RI PARA AMOSTRAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN. (1) MARCADOR MOLECULAR 1 KB (INVITROGEN); (2) CEPA DE REFERÊNCIA NC-1 DE *N. caninum* – CONTROLE POSITIVO; (3) CEPA DE REFERÊNCIA RH DE *T.gondii* – CONTROLE POSITIVO; (4) CONTROLE NEGATIVO; (5) REP 06, (6) REP 04, (7) REP 02, (8) REP 07 E (9) REP 03 AMOSTRAS POSITIVAS OBTIDAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN. TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO: 344 PB.

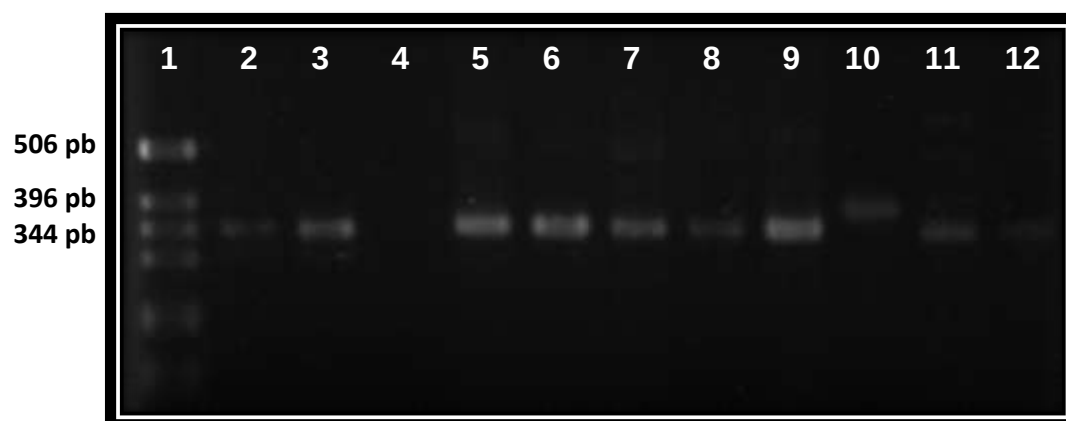


FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DE PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S UTILIZANDO OS INICIADORES FE/RE E FE/RI PARA AMOSTRAS DO SÊMEN *IN NATURA*. (1) MARCADOR MOLECULAR 1 KB (INVITROGEN); (2) CEPA DE REFERÊNCIA NC-1 DE *N. caninum* – CONTROLE POSITIVO; (3) CEPA DE REFERÊNCIA RH DE *T.gondii* – CONTROLE POSITIVO; (4) CONTROLE NEGATIVO; (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) E (12) AMOSTRAS POSITIVAS DO SÊMEN *IN NATURA* DE TODOS OS REPRODUTORES ANALISADOS. TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO: 344 PB.

3.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA REGIÃO 18S

As sequências da região 18S obtidas do cultivo celular do sêmen apresentaram 99% de similaridade às sequências de *Acanthamoeba rhysodes* e *Acanthamoeba castellanii*. As sequências do sêmen *in natura* foram compatíveis com sequências de espécies de plantas, como *Fallopia multiflora*, *Glycine max*, *Brachypodium distachyon* e *Solanum tuberosum*. As sequências consenso dos produtos de amplificação da região 18S das amostras obtidas do cultivo celular do sêmen encontram-se na tabela 7 e do sêmen *in natura*, na tabela 8.

TABELA 7 – SEQUÊNCIAS CONSENSO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN

AMOSTRAS OBTIDAS DO CULTIVO CELULAR DO SÊMEN	SEQUÊNCIA CONSENSO
REP 02	ttgccaggaagtttgaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgttctgggcccgcacgcgcg ctacactgattaatccaacgagtcggttcaatcgaggcgcatgccgtgcgggtcaaaccg cactgcgtcgtctcctgatcgccgtgggcccgataggccgggtaattcttgaaatattaatcgt gctggggatagatcattgtaattattgatcttcaacgaggaattcctagtaagcgcgagtcacagc tcggttgattacgtccctgccctttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaatggtccggt gaaatcctcggagccgtggcctctacgcaatccgggcaaccgggttgtaggtctcccctttgg cggcgaagtcgattgaacctaacatttagaggaaggaac
REP 03	gcaaggaagtttgaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgttctgggcccgcacgcgcgcta cactgatgtattcaacgagtatacaccttgccgacaggcccgggtaattctgggaaattcatcgt gatggggatagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaattcctagtaagcgcgagtcacag ctcgcgttgactacgtccctgccctttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaatggtccggt gaagtgttcggatcgccgacgggagcgggttcgcccctcgacgtcgcgagaagtccattga acctaacacttagaggaaggagcgtcgggcg
REP 04	tgcaaggaagtttgaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgttctgggcccgcacgcgcgct acactgatgtattcaacgagtcctatagccttgccgacaggccgggtaattcttgaaattcatcgtg atggggatagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaattcctagtaagcgcgagtcacagtc gcgttgactacgtccctgccctttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaatggtccggtgaa gtgttcgggattcgccgacgtgagcgggtcgtgcccgacgttgtagaagtccacgaacct taacatttaaaggaagga
REP 06	caaggaagtttgaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgttctgggcccgcacgcgcgctac actgatgtattcaacgagcttatagccttgccgacaggcccgggtaattcttgaaattcatcgtgat ggggatagatcattgcaattgttggttttcaacgaggaattcctagtaagcgcgagtcacagtcgc gttgactacgtccctgccctttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaatgatccggtgaaat gttcggatcgccgacgtgggcggttcgtgcccgacgtcgcgagaagtccattgaacctta acacttagaggaagga
REP 07	aacagtagtctagtcaccttgaaggaagtcttgaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgt tctgggcccgcacgcgcgctacactgatgtattcaacgagtcctacaccttgccgacaggccggg taattcttgaaattcatcgtgatggggatagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaattcctagt aagcgcgagtcacagctcgcgttgactacgtccctgccctttgtacacaccgcccgtcgtcctac cgattgaatggtccggtgaagtgttcggatcgccgacgtgggcggttcgtgccggcgacgtc gcgagaagtc cactgaaccttaaatgaagaggaaggaa

TABELA 8– SEQUÊNCIAS CONSENSO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 18S DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO SÊMEN *IN NATURA*

AMOSTRAS DO SÊMEN <i>in natura</i>	SEQUÊNCIA CONSENSO
REP 03	tttgaggcaataacagggctgtagtgccttagatgttctgggcccgcacgcgcgtacactgatgt attcaacgagtatatcaccttgccgacaggccccgggtaattctgggaaatttcacgtgatggg atagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaatgcctagtaagcgcgagtcacagctcgcgt gactacgtccctgcccttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaatggtcgggtgaagt gttcggatcgcggcgcgggagcggatgccgccctcagtcgcgagaagtcattgaacctt aacacttaaag
REP 04	aacagtagtctagtcattccttgaaggaagttctgaggcaataacaggctctgtagtgccttagat gttctgggcccgcacgcgcgtacactgatgtattcaacgagtcattcaccttgccgacaggctc gggtaattcttgaaatttcacgtgatgggtagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaattc ctagtaagcgcgagtcacagctcgcgttgactacgtcccttgcccttgtacacaccgcccgtcg ctcctaccgattgaatggtcgggtgaagtgttcggatcgcggcgcagctgggcggttcgctgccg gcgacgtcgcgagaagtcactgaacctaaatgaagaggaaggaa
REP 06	tgcaaggaagtttgaggcaataacaggctctgtagtgccttagatgttctgggcccgcacgcgc gctacactgatgtattcaacgagtcattatagccttgccgacaggccgggtaattcttgaaatttc atcgtgatgggtagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaattcctagtaagcgcgag tcacagctcgcgttgactacgtcccttgcccttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattga atggtcgggtgaagtgttcggattgcggcgcagtgagcgggttcgctgcccgcgacgcgtga gaagtccactgaaccttaacacttaaag
REP 07	gcaaggaagtttgaggcaataacaggctctgtagtgccttagatgttctgggcccgcacgcgcgt acactgatgtattcaacgagtcattatagccttgccgacaggccccgggtaattcttggaatttc cgtgatgggtagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaatgcctagtaagcgcgagtc tcagctcgcgttgactacgtcccttgcccttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaatgg tccgggtgaagtgttcggatcgcggcgcagggggcggttcgcccgcacgcgcgagaa gtccattgaaccttaacattcagaggaaggaa
REP 08	tgcaaggaagtttgaggcaataacaggctctgtagtgccttagatgttctgggcccgcacgcgc gctacactgatgtattcaacgagtcattatagccttgccgacaggccgggtaattcttgaaatttc atcgtgatgggtagatcattgcaattgttggtcttcaacgaggaattcctagtaagcgcgag catcagctcgcgttgactacgtcccttgcccttgtacacaccgcccgtcgtcctaccgattgaa tggtcgggtgaagtgttcgggattgcggcgcagtgagcgggttcgctgcccgcgacgttg agaagtcacacgaaccttaacattaaaggaaggaa

4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado investigando a presença dos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen de equinos. A ausência desses protozoários no sêmen dos reprodutores equinos analisados, observado através da PCR, não pode ser considerada um resultado confirmatório, pois uma baixa quantidade de DNA do parasita poderia estar presente nas amostras de sêmen e ser insuficiente para visualizar amplificação do DNA.

Nos estudos realizados com outras espécies, como em bovinos e ovinos, em que foram detectados a presença de DNA de protozoários no sêmen, os animais submetidos à colheita de sêmen eram soropositivos aos protozoários pesquisados, *N. caninum* (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.* 2005) e *T. gondii* (MORAES *et al.*, 2010). Neste estudo, os reprodutores equinos analisados foram todos soronegativos para ambos protozoários, inclusive os animais 5 e 6, provenientes da propriedade 2, a que apresentou maior soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* sp. nas éguas com histórico de falhas reprodutivas, e que apresentou bovinos e cães soropositivos ao protozoário (Capítulo 1), porém não foi realizado um monitoramento sorológico e a colheita de sangue foi realizada no mesmo dia da colheita de sêmen. Em éguas prenhes já foi observado uma flutuação no título de anticorpos de *Neospora* sp. (KORMANN *et al.*, 2008). Ferre *et al.* (2005) observaram uma flutuação no título de anticorpos IgG em touros soropositivos, chegando a limites inferiores ao do ponto de corte adotado, e não observaram associação entre a presença de *N. caninum* no sêmen e no sangue dos animais.

Neste trabalho apenas um ejaculado de cada animal foi analisado, um fator que contribuiu para reduzir a possibilidade de detectar os protozoários *N. caninum* e *T. gondii* no sêmen pelas técnicas empregadas, cultivo celular e PCR. Em bovinos, a detecção de DNA de *N. caninum* no sêmen ocorreu de forma esporádica, tanto em touros naturalmente quanto experimentalmente infectados e observou-se uma baixa carga parasitária (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; SERRANO-MARTÍNEZ *et al.*, 2007b; FERRE *et al.* 2005; 2008).

O cultivo celular das amostras de sêmen foi observado durante 60 dias, segundo Dubey *et al.* (1998) os inóculos podem conter poucos parasitas, o período

de adaptação das cepas de *Neospora* ao cultivo pode variar ou depender da célula usada no cultivo. Neste estudo, somente a porção contendo os espermatozóides foi inoculada no cultivo celular. Em bovinos a presença de DNA de *N. caninum* somente foi detectada nas amostras provenientes da fração celular e não do plasma seminal (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005). Entretanto a presença de componentes inibitórios presentes na fração celular do sêmen foi relatada por Von Beroldingen *et al.* (1990) e Van der Engelenburg *et al.* (1993). A cabeça do espermatozóide contém a maior parte do DNA presente no sêmen e pode causar efeitos inibitórios na PCR (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003).

As extrações de DNA das amostras do sêmen *in natura* foram realizadas pelo método de fenol-clorofórmio, de acordo com Sambrook e Russel (2001). Lopes *et al.* (2010) utilizaram a mesma técnica para extração de DNA de *T. gondii* em amostras de sêmen de carneiros, cujos animais foram experimentalmente infectados pelo parasita.

A técnica de PCR convencional utilizada com os *primers* Np6/Np21 e ITS2/ITS5, apresentam uma alta sensibilidade, tendo sido utilizadas em diferentes estudos para detecção de DNA de *N. caninum* em fetos bovinos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003), em ovinos (PENA *et al.*, 2007), em capivaras (TRUPPEL *et al.*, 2010) e em embriões de frangos (KHODAKARAM-TAFTI *et al.*, 2012).

Nos estudos realizados em bovinos, a técnica de *nested* PCR foi utilizada para detectar a presença de DNA de *N. caninum* tanto no sêmen fresco, não diluído, de touros naturalmente infectados (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003), como no sêmen resfriado ou congelado, diluído, de touros naturalmente infectados (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005) e experimentalmente infectados (FERRE *et al.*, 2008).

Os *primers* 18S FE/RE/RI utilizados na técnica de *hemi-nested* PCR neste estudo foram desenvolvidos por Miller *et al.* (2008) para confirmação ultra-estrutural e molecular de cistos de *Sarcocystis neurona* em tecidos do SNC de lontras marinhas. As amplificações que ocorreram em cinco amostras do cultivo celular do sêmen e em todas do sêmen *in natura* foram sequenciadas, porém as sequências obtidas não foram compatíveis com os protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii*. Os resultados encontrados no cultivo celular do sêmen foram compatíveis com *Acanthamoeba rhyodes* e *Acanthamoeba castellanii*, amebas de vida livre que são

encontradas principalmente no solo, água e ar, estando presente em todos os continentes e climas (MARTINEZ; VISVESVARA, 1997). Esses protozoários podem ser provenientes do ambiente e estarem presentes no prepúcio, contaminando o sêmen. E podem ser hospedeiros de vários patógenos intracelulares como bactérias, *Legionella pneumophila* (NEWTON *et al.*, 2010), *Chlamydia* spp. (AMANN *et al.*, 1997), *Listeria monocytogenes* (LY *et al.*, 1990), *Salmoella enterica* (TEZCAN-MERDOL *et al.*, 2004), *Mycobacterium bovis* (TAYLOR *et al.*, 2003), *Mycobacterium avis* (WHAN *et al.*, 2006), e vírus, mimivirus, parasita obrigatório do protozoário *Acanthamoeba polyphaga* (LA SCOLA *et al.*, 2003), o maior vírus conhecido até hoje, responsável por causar pneumonia em humanos (VICENT *et al.*, 2010). Mais estudos devem ser realizados para comprovar a presença da *Acanthamoeba* spp. no sêmen de equinos.

No sequenciamento da região 18S das amostras do sêmen *in natura* foram encontradas sequências de espécies de plantas, como *Fallopia multiflora*, *Glycine max*, *Brachypodium distachyon* e *Solanum tuberosum*, demonstrando que os primers FE/RE/RI utilizados não foram específicos para os protozoários pesquisados *N. caninum*, *T. gondii* e *S. neurona*.

Os estudos realizados sobre a possibilidade da transmissão venérea de *N. caninum* concentram-se na espécie bovina (CANADA *et al.*, 2006; SERRANO *et al.*, 2006; SERRANO-MARTÍNEZ *et al.*, 2007a), desde que foi detectado a presença deste protozoário no sêmen de touros naturalmente infectados (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003). Serrano *et al.* (2006) demonstraram que novilhas inseminadas com sêmen contaminado com 10^7 taquizoítas de *N. caninum* apresentaram soroconversão, o parasita foi detectado no sangue e em alguns órgãos (cérebro, fígado, pulmão, útero) através da *nested*-PCR. A taxa de prenhez do grupo infectado foi bem inferior (11,1%) quando comparada com o grupo controle (66,6%), indicando que a transmissão horizontal, através do sêmen é possível.

No Brasil, Pituco *et al.* (2005) realizaram uma pesquisa de *N. caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil, através da PCR. Com os primers Np6/Np21, nenhuma amostra foi positiva, enquanto que pela *hemi-nested* PCR, com os primers Np4/Np7 e Np6/Np7, uma amostra de sêmen foi positiva, de um total de 55 amostras de sêmen analisadas. E somente os touros soropositivos ao protozoário *N. caninum* tiveram o sêmen analisado.

Em estudos realizados com outras espécies, avaliando alterações no perfil seminal (volume, motilidade, concentração, vigor e morfologia espermática) em animais inoculados com *T. gondii*, não foram observadas alterações em suínos (DE MOURA *et al.*, 2004), e em ovinos, observou-se apenas alteração no volume do ejaculado (LOPES *et al.*, 2009). Através da PCR, a presença de DNA de *T. gondii* em cães foi detectada em fragmentos do testículo e epidídimo (ARANTES *et al.*, 2009) e em amostras teciduais de próstata, testículo, vesícula seminal e epidídimo de caprinos inoculados com taquizoítas e oocistos (SANTANA *et al.*, 2010).

O isolamento de *N. caninum* em cultivo celular e em camundongos é considerado difícil, sendo que o isolamento *in vitro* é o mais utilizado para obtenção de cepas de *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2000). Em células Vero, o isolamento de *N. caninum* foi realizado em fetos bovinos (LOCATELLI-DITTRICH, 2002; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003) e em fetos equinos (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

A técnica da PCR pode ser um método vantajoso, quando associado a outro meio de diagnóstico (ELLIS, 1998). Scarpelli (2001) na espécie bovina detectou em amostras seminais o *T. gondii* (cepas P e RH), por meio da bioprova, em diversas datas pós-inoculação (do 7º ao 84º DPI). Entretanto, a técnica de PCR não foi tão sensível/específica na detecção do parasito no sêmen de bovinos experimentalmente infectados. Semelhantemente Moura (2004), em suínos, obteve pouco sucesso no emprego da PCR para detecção de *T. gondii* no sêmen de cachaços infectados experimentalmente.

5 CONCLUSÃO

Em reprodutores equinos clinicamente saudáveis, provenientes de propriedades com histórico de falhas reprodutivas em éguas, localizados nos estados do Paraná e de Santa Catarina, não foi observado a presença de *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen analisado desses animais, através das técnicas de isolamento em cultivo celular e da PCR.

6 PERSPECTIVAS

A ausência dos protozoários *Neospora* sp. e *T. gondii* no sêmen dos equinos analisados neste estudo não permite excluir a possibilidade da transmissão venérea desses parasitas na espécie equina.

Estudos posteriores devem ser realizados em propriedades com problemas reprodutivos em éguas visando o isolamento do parasito no sêmen dos garanhões e a caracterização da cepa isolada para confirmar a hipótese aventada no presente estudo. Um resultado positivo implicaria numa repercussão no manejo e nas biotécnicas aplicadas, principalmente quanto à inseminação artificial (IA), por ser amplamente utilizada em criações de equinos.

Mais estudos devem ser realizados para comprovar a presença e a importância da *Acanthamoeba* spp. no sêmen de equinos.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.; SPRINGER, N.; SCHONHUBER, W.; LUDWIG, W.; SCHMID, E.N.; MULLER, K.D.; MICHEL, R.. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.115–121, 1997.

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.S.P.; PINTO, V.M.R.; SAKAMOTO, C.A.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by sêmen in dogs. **Experimental Parasitology**, v.123, p.190-194, 2009.

BARRANDEGUY, M.; THIRY, E. Equine coital exanthema and its potencial economic implications fot the equine industry. **The Veterinary Journal**, v.191, p.35-40, 2012.

CABRAL, A.D.; CAMARGO, C.N.; GALLETI, N.T.; OKUDA, L.H.; PITUCO, E.M.; FAVA, C.D. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.14-19, 2009.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C., ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329-1336, 2004.

CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; FERREIRA, P.; CORREIA DA COSTA, J.M.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.109-114, 2006.

CARVALHO, R.; PASSOS, L.M.F.; OLIVEIRA, A.M.; HENRY, M.; MARTINS, A.S. Detection of equine herpesvirus 1 DNA in a single embryo and in horse semen by polymerase chain reaction. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.4, 2000.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1194-1198, 2002.

CORONA, A.; CHERCHI, R. Microbial quality of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p.103-109, 2009.

COUTO, M.A.; HUGHES, J.P. Sexually transmitted (venereal) diseases of horses. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, p.845-854, 1993.

DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDEL, S.; SPEER, C.A.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.8, p.1293-1304, 1998.

DUBEY, J.P.; LIDDELL, S.; MATTSON, D.; SPEER, C.A.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 345-353, 2001.

ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1053-1060, 1998.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p. 1504-1518, 2005.

FERRE, I.; SERRANO-MARTÍNEZ, E.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v.69, p.905–911, 2008.

GERBI, S.A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Plenum, p.419-517, 1985.

GONDIM, L.F.P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004.

HEBIA-FELLAH, I.; LÉAUTÉ, A.; , FIÉNI, F.; ZIENTARA, S.; IMBERT-MARCILLE, B.M.; BESSE, B.; FORTIER, G.; PRONOST, S.; MISZCZAK, F.; FERRY, B.; THORIN, C.; PELLERIN, J.L.; BRUYAS, J.F. Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR). **Theriogenology**, v.71, p.1381–1389, 2009.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely Review of Biology**, Ithaca, v.66, n.4, p.411-453, 1991.

HODDER, A.D.J.; BROWN, J.; , BALL, B.A.; LIU, I.K.M.; LEUTENEGGER, C.; PUSTERLA, N. Analysis of equine semen for equine herpesvirus 1 using taqman PCR. **Theriogenology**, v. 68, p. 492–518, 2007.

HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; KNAPEN, F.V. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v.83, p.285-289, 1997.

KHODAKARAM-TAFTIA, A.; MANSOURIAN, M.; NAMAVARI, M.; HOSSEINI, A. Immunohistochemical and polymerase chain reaction studies in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.10– 13, 2012.

KIM, J.; SOHN, H.; HWANG, W.; HWANG, E.; JEAN, Y.; YAMANE, I.; KIM, D. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. **Veterinary Parasitology**, v.90, n.1-2, p.147-154, 2000.

KORMANN, D.C.S.H.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; ANTUNES, J.; DITTRICH, J.R.; PATRÍCIO, L.F.I. Soroprevalência e cinética mensal de anticorpos anti- *Neospora* sp. em éguas gestantes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n. 1, p. 335-338, 2008.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D. A giant virus in amoebae. **Science**, v. 299, p. 2033, 2003.

LEON, A.; RICHARD, E.; FORTIER, C.; LAUGIER, C.; FORTIER, G.; PRONOST, S. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. **Preventive Veterinary Medicine**, v.104, n.1-2, p.179-183, 2011.

LOCATELLI-DITTRICH R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil. **Tese** (Doutorado em Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002.

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

LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; SOUZA, F.A.; RODRIGUES, J.D.F.; COSTA, G.H.N.; SOARES, V.E.; SILVA, G.S. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.312-319, 2009.

LOPES, W.D.Z. Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (*ovis aries*) machos experimentalmente infectados. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

LY, T.M.C.; MULLER, H.E. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. **Journal of Medical Microbiology**, v.33, p.51–54, 1990.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L. de. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, p.101-129, 2002.

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.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, v.7, p.583–598, 1997.

MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J.; MAYER, R.; SANCHEZ, S.; NISTAL, M. Protozoan infections in the male genital tract. **Journal of Urology**, v.156, p.340-349, 1996.

METCALF, E.S. The effect of post-insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. **Procediments of American Association of Equine Practitioners**, v.46, p.332-334, 2000.

METCALF, E.S. The role of international transport of equine semen on disease transmission. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 229–237, 2001.

MILLER, M.A.; BARR, B.C.; NORDHAUSEN, R.; JAMES, E.R.;, MAGARGAL, S.L.; MURRAY, M.; P.A. CONRAD, P.A.; TOY-CHOUTKA, S.; D.A. JESSUP, D.A.; GRIGG, M.E. Ultrastructural and molecular confirmation of the development of *Sarcocystis neurona* tissue cysts in the central nervous system of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal of Parasitology**, v.39, n.12, p.1363-1372, 2009.

MORAES, E.P.B.X.; FARIA, E.B.; BATISTA, A.M.; FREITA, A.C.; SILVA, J.C.R.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; MOTA, R.A. Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.915-917, 2010.

MOURA, A.B.; FILHO, S.J.; DI MAURO, D.C.; PAIM, B.B.; PINTO, F.R.; DA COSTA, A.J. Avaliação dos parâmetros seminais de cachorros (*Sus scrofa*) experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 107-116, 2004.

MOURA, A.B.; COSTA, A.; JORDÃO FILHO, S.; PAIM, B.B.; PINTO, F.R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in sêmen of experimental infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.430-434, 2007.

NEWTON, H. J.; ANG, D.K.Y.; VAN DRIEL, I.R. ; HARTLAND, E.L. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, p.274-298, 2010.

ORTEGA-MORA L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.301-308, 2003.

PARLEVLIET, J.M.; SAMPER, J.C. Disease transmission through semen. In: SAMPER J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

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.

PITUCO E.M.; OKUDA, L.H.; DEL-FAVA, C.; STEFANO, E.; SHIMOZONO, O.S.; CAMARGO, C.N.; GALETTI, N.T.C.; OLIVEIRA, M.C.T.; RODRIGUES, L.H. Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. In: **I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum***, p. 39-41, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Press, New York, USA, 3 ed., 2001.

SAMPER, J.C.; TIBARY, A. Disease transmission in horses. **Theriogenology**, v. 66, p. 551-559, 2006.

SANTANA, L.F.; DA COSTA, A.J.; PIERONI, J.; LOPES, W.D.Z.; SANTOS, R.S.; DE OLIVEIRA, G.P.; DE MENDONÇA, R.P.; SAKAMOTO, C.A.M. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.3, p.179-182, 2010.

SCARPELLI, L.C. Viabilidade da transmissão venérea do *Toxoplasma gondii* em bovinos., **Dissertação** (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

SCARPELLI, L.; LOPES, W.D.Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p.59-64, 2009.

SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M.T.; HUESLER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.11, n.3, p.513-522, 1994.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.197-203, 2006.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R.A.; MARTÍNEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v.67, p.729–37, 2007a.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v.67, p.1175–1184, 2007b.

TAYLOR, S.J.; AHONEN, L.J.; DE LEIJ, F.A.; DALE, J.W. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and Survival of *M. bovis* within the Amoebae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.4316-4319, 2003.

TIMONEY, P.J.; McCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis: further characterization of the carrier state in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.3-11, 2000.

TRUPPEL, J.H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R.R.; VILANI, R.G.; REIFUR, L.; BOERGER, W.; DACOSTA-RIBEIRO, M.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology International**, v.59, n.3, p.376-379, 2010.

VAN DER ENGELBURG, F.A.C.; MAES, R.K.; VAN DER OIRSCHOT, J.T.; VAN RIJSEWIJK, F.A.M. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.3129–3135, 1993.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPA ZIAN, L. Advances in Mimivirus pathogenicity. **Intervirology**, v.53, p.304-309, 2010.

VON BEROLDINGEN, C.H.; BLAKE, E.T.; HIGUCHI, R.; SENSABAUGH, G.F.; ERLICH, H.A. Applications of PCR to the analysis of biological evidence. In: ERLICH, H.A. (Ed.), **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**, v. 1, Stockton Press, New York, p. 209–223, 1990.

WENG, L.; RUBIN, E.M.; BRISTOW, J. Application of sequence-based methods in human microbial ecology. **Genome Research**, v. 16, p. 316-322, 2006.

WHAN, L.; GRANT, I.R.; ROWE, M.T. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. **BioMed Central Microbiology**, v.6, p.63, 2006.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR protocols, a guide for methods and applications**, Academic Press, p. 315-322, 1990.

WOOD, J.L.N.; CHIRNSIDE, E.D.; MUMFORD, J.A.; HIGGINS, A.J. First recorded outbreak of equine viral arteritis in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 136, n.15, p. 381-385, 1995.

WOOD, J.L.N.; CARDWELL, J.M.; CASTILLO-OLIVARES, J.; IRWIN, V. Transmission of diseases through semen. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. St. Louis, USA: Saunders Elsevier, cap. 42, p.266-274, 2007.

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

YANG S.; ROTHMAN, R. PCR- based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, v. 4, p. 337-348, 2004.

ANEXO 1

PROTOCOLO: Técnica de extração de DNA de parasita pelo método de fenol-clorofórmio, adaptado de Sambrook e Russel (2001).

1. Lise celular e eliminação do RNA

- adicionar à amostra homogeneizada 400 µL de tampão Tris-EDTA (10mM Tris HCl pH 8,0; 01 mM EDTA pH 8,0).
- adicionar 50 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio, 10%).
- adicionar 5 µL de RNase (20mg/mL).
- homogeneizar lentamente.
- incubar em banho-maria a 37°C durante 2 horas.
- adicionar 5 µL de proteinase K (20mg/mL)
- incubar em banho-maria a 55°C, durante 14 horas (“overnight”).

2. Fase de desproteinização

- adicionar a solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), volume/volume (500 µL).
- homogeneizar lentamente.
- centrifugar a 7.400 g durante 5 minutos, a 20° C.
- recuperar a fase aquosa superior e transferir para outro microtubo.
- adicionar clorofórmio, volume/volume (500 µL).
- homogeneizar lentamente.
- centrifugar a 7.400 g durante 5 minutos, a 20° C.
- recuperar a fase aquosa superior e transferir para outro microtubo.
- fazer uma 2ª extração com clorofórmio, repetir os quatro passos anteriores.

3. Fase de precipitação do DNA

- adicionar 30 µL de acetato de sódio a 3M (10% do volume final).

- adicionar 625 μL (2,5 volumes) de etanol absoluto gelado.
- homogeneizar gentilmente por inversão.
- centrifugar a 7.400 g durante 30 minutos, a 4° C.
- desprezar o sobrenadante.
- adicionar 300 μL de etanol 70% e ressuspender o sedimento com cuidado (DNA fica aderido à parede do tubo).
- centrifugar a 7.400 g, durante 15 minutos, a 4°C.
- desprezar o sobrenadante.
- repetir os últimos três passos mais uma vez.
- desprezar o etanol após cada lavagem. Na última, deixar secar na estufa à temperatura de 37°C.
- após secagem ressuspender o DNA em 100 μL de água ultrapura.
- manter a temperatura de 4°C, durante 14 horas, *overnight*.
- armazenar as amostras a -20°C até a sua utilização.

ANEXO 2

PROTOCOLO: Técnica de extração de DNA de amostras de sêmen de equinos pelo método de fenol-clorofórmio, adaptado de Sambrook e Russel (2001).

1. Lise celular e eliminação do RNA

- transferir uma alíquota de 100 µL de sêmen para um microtubo de 1500 µL.
- adicionar 900 µL de tampão PBS, pH 7,2, previamente autoclavado e homogeneizar.
- centrifugar a 4.736 g por 6 minutos para lavagem.
- desprezar o sobrenadante.
- acrescentar ao sedimento, 100 µL de PBS e 400 µL da solução de lise (2% β-mercaptoetanol; 10 mM tris, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS e 100 mM de NaCl).
- homogeneizar a amostra em agitador de tubos.
- incubar em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.
- adicionar 5µL de Proteinase K (200 µg/mL).
- incubar em banho-maria a 37°C durante 14 horas, *overnight*.

2. Fase de desproteinização

- adicionar a solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), volume/volume (500 µL).
- homogeneizar lentamente.
- centrifugar a 7.400 g durante 5 minutos, a 20° C.
- recuperar a fase aquosa superior e transferir para outro microtubo.
- repetir os últimos quatro passos mais uma vez.
- adicionar clorofórmio, volume/volume (500 µL).
- homogeneizar lentamente.
- centrifugar a 7.400 g durante 5 minutos, a 20° C.

- recuperar a fase aquosa superior e transferir para outro microtubo.
- fazer uma 2ª extração com clorofórmio, repetir os quatro passos anteriores.

3. Fase de precipitação do DNA

- adicionar 30 µL de acetato de sódio a 3M (10% do volume final).
- adicionar 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado.
- homogeneizar gentilmente por inversão.
- centrifugar a 10.650 g durante 20 minutos, a 4° C.
- desprezar o sobrenadante.
- adicionar 900 µL de etanol 70% e ressuspender o sedimento com cuidado (DNA fica aderido à parede do tubo).
- centrifugar a 10.650 g, durante 20 minutos, a 4°C.
- desprezar o sobrenadante.
- repetir os últimos três passos mais uma vez.
- desprezar o etanol após cada lavagem. Na última, deixar secar na estufa à temperatura de 37°C.
- após secagem ressuspender o DNA em 50 µL de água ultrapura.
- manter a temperatura de 4°C, durante 14 horas, *overnight*.
- armazenar as amostras a -20°C até a sua utilização.

ANEXO 3

PROTOCOLO: Purificação para reação de sequenciamento

- Em tubo de 500 μL adicionar 45 μL do produto de PCR;
- Adicionar 30 μL de acetato de amônio 7,5 M;
- Adicionar 90 μL de etanol absoluto e homogeneizar em vortex;
- Centrifugar a 12.500 g por 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida descartar o sobrenadante, usando micropipeta e colocando a ponteira do lado oposto ao *pellet*;
- Adicionar lentamente 200 μL de etanol 70%;
- Centrifugar a 12.500 g por 15 minutos a temperatura ambiente e descartar o sobrenadante;
- Secar em estufa a 37°C por 15 minutos;
- Dissolver o DNA em 20 μL de água ultrapura. Deixar em repouso por 15 minutos para completa dissolução;
- Fazer eletroforese em gel de agarose com 3 μL do DNA purificado.

ANEXO 4

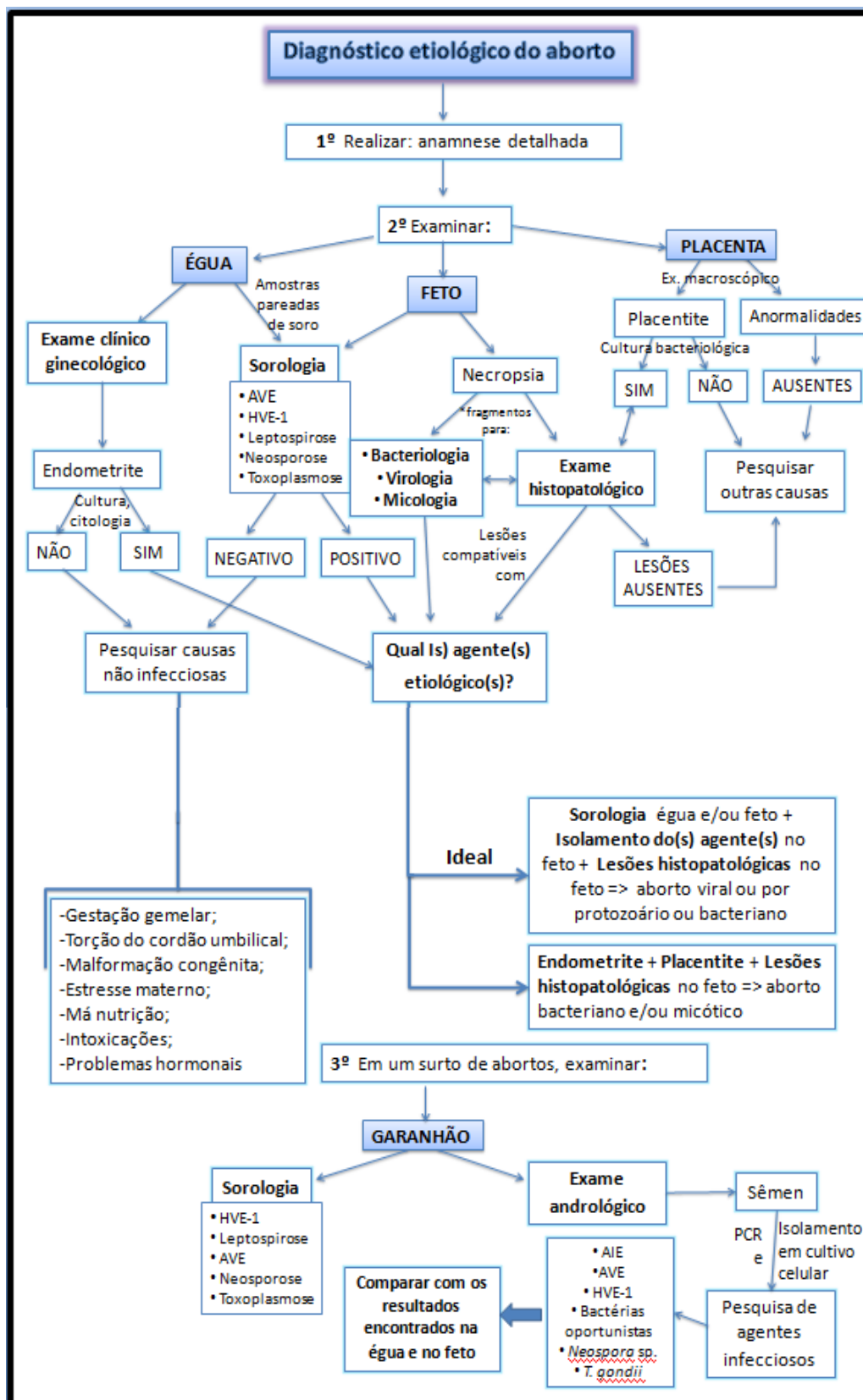


FIGURA 7- DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DO ABORTO EM ÉGUAS
FONTE: O AUTOR, 2013