

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA DORIA RIBEIRO CABRAL

TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* EM ÉGUAS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS (PSI)

CURITIBA

2020

LUCIANA DORIA RIBEIRO CABRAL

TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis*
neurona EM ÉGUAS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS (PSI)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosangela Locatelli
Dittrich

CURITIBA

2020

Cabral, Luciana Doria Ribeiro
Transmissão vertical de *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e
Sarcocystis neurona em éguas da raça puro sangue inglês (PSI). /
Luciana Doria Ribeiro Cabral. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Orientadora: Rosângela Locatelli Dittrich.

1. Doenças Infecciosas Parasitárias. 2. Éguas. 3. Sistema nervoso -
Doenças. 4. Saúde reprodutiva - Doenças. I. Dittrich, Rosângela Locatelli.
II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

Sistema de Bibliotecas/UFPR
Guilherme Luiz Cintra Neves - CRB9/1572



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de LUCIANA DORIA RIBEIRO CABRAL intitulada: *Transmissão vertical de Toxoplasma gondii, Neospora spp. e Sarcocystis neurona em éguas da raça Puro Sangue Inglês (PSI)*, sob orientação da Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH, que após terem Inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica

14/05/2020 17:31:25.0

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/05/2020 12:19:51.0

MARIA CONSTANZA RODRIGUEZ

Avallador Externo (ADAPAR)

Assinatura Eletrônica

15/05/2020 12:07:49.0

ROMILDO ROMUALDO WEISS

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: ppgov.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte Identificação Única: 41546

Para autenticar este documento eletrônico, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/vistoria/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 41048

Dedico este trabalho à minha irmã Anna Doria,
pela cumplicidade e por, em muitos momentos,
acreditar em meu potencial mais do que eu
mesma acreditei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, fortalecendo-me a cada dia e amparando-me nos momentos difíceis e por ter colocado durante esta trajetória pessoas que levo para a vida.

Agradeço aos meus pais, Eliudes Cabral e Rosana Doria Ribeiro Cabral, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas. Quando resolvi prestar o mestrado não foi diferente. Obrigada pela educação e valores que me foram passados.

A Regis Tadao Nosso agradeço por sempre estar do meu lado, apoiando e confortando diante as dificuldades.

Agradeço a minha cunhada, Amanda Branco, que esteve sempre por perto em todas os momentos. Principalmente nessa reta final, quando apareceu o bendito inglês, você ajudou muito nesse momento bilíngue.

Aos meus tios Eliakim Cabral Junior e Eliane Xavier Thereza Cabral, que sempre foram como pais. Foram palavras de conforto, conselhos e incentivos para que mais uma etapa fosse concluída.

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Rosangela Locatelli Dittrich, pela confiança e pela oportunidade em fazer o mestrado, que me proporcionou um enriquecimento profissional dentro de uma área da veterinária que eu nunca imaginaria trabalhar.

Agradeço ao Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, pelas conversas e conselhos durante estes dois anos de mestrando.

Agradeço à “Família Grude” que formei durante a Pós-Graduação. Caroline Tomasi Bortoleto, que hoje é uma irmã, sempre pronta para uma boa conversar entre choros e risos. Lais Giuliani Felipetto, amiga, conselheira e companheira: uma gaúcha que veio para ensinar que não existe tempo ruim. Pedro Irineu Teider Junior, sempre pronto para falar o que pensa, sem papas na língua. Formei com vocês uma família que estará eternamente no meu coração.

Agradeço a Ana Paula Sato, pois muito do que sei, devo a ela. Conversas, desabafos, risadas, troca de experiências: foram dois anos de convivência que me fizeram admirá-la pelo amor que tem pela ciência.

À Universidade Federal do Paraná e a Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, pela oportunidade de aprendizado e de cursar o programa,

para me tornar Mestre em Ciências Veterinárias. Aos funcionários que auxiliam no andamento da universidade, em especial à Louise Cândido, Kelly Barba e Olair Beltrame, as quais sempre estavam dispostos a tirar dúvidas e ensinar técnicas básicas de laboratório, que foram extremamente úteis para a elaboração deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Giovana Scuiatti, Gabriela Paz Augusto Pinto, Wesley Oliveira, Aline Konell e Flavia Moreira. Passei com vocês a maior parte do tempo e, com certeza, os dias não serão mais os mesmos sem vocês. Foram muitas risadas, conversas, cafés com carinho e bolos, apesar das várias tentativas de dietas de todos.

Aos professores Rafael Felipe da Costa Vieira e Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira pelo, pelo conhecimento compartilhado e por sempre estarem dispostos a sanar minhas dúvidas em biologia molecular.

Agradeço a Maria Constanza Rodriguez e Patrícia Sayuri do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME), que foram pacientes em ensinar e deixar acompanhar a rotina de trabalho, para que eu pudesse aprender mais sobre as técnicas de biologia molecular. Sempre muito atenciosas e dispostas a ajudar.

Ao professor Renato Silva de Souza e à residente Ana Paula Rossa, pela confecção e leitura das lâminas histológicas, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

Ao Adrien Wilhelem Dilger Sanches, pela ajuda na leitura das lâminas histológicas.

Agradeço à Raquel Jahnel Cangelli, do Haras Las Madres, Guilherme Colaço da Coudelaria colaço e ao Dr Daniel Mendes Campos do haras Santa Rita da Serra, que abriram as portas para a execução deste projeto. Ao Erineu Carbornar (Nereu), funcionário do Haras Santa Rita da Serra, que esteve presente em todos os partos, auxiliando na coleta das amostras. Não posso esquecer de agradecer a Monalisa Lukascek de Castro, que além de intermediar os contatos com o pessoal da Coudelaria Colaço, esteve presente em alguns partos, sempre pronta a ajudar nas coletas das amostras.

Agradeço aos animais, sem eles nada disso seria possível. Foram noites mal dormidas, temperaturas baixas, serração, para poder acompanhar uma das coisas mais lindas que Deus proporcionou a um ser vivo, gerar uma vida. Assistir o nascimento dos potros desse projeto foi gratificante.

Aos que indiretamente fizeram parte desta etapa e não estão citados, muito obrigado! Não serem mencionados não os tornam menos importantes diante desta conquista.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

As doenças infecto-parasitárias causam prejuízos na criação de equinos. Os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* estão relacionados às doenças neurológicas e reprodutivas em equinos. Em cavalos, *T. gondii* e *Neospora* spp. podem ser transmitidos via horizontal e vertical. *Sarcocystis neurona* causa a Mieloencefalite Protozoária Equina (MEP). Existem poucos estudos que avaliaram a presença dos protozoários em placentas de éguas e até o presente, não foram encontrados trabalhos em amostras de líquido amniótico. A presente dissertação foi dividida em dois capítulos. O capítulo I objetivou detectar e monitorar os anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora* spp. e anti-*Sarcocystis neurona* em éguas prenhas e verificar a exposição intra-uterina dos parasitas, pela pesquisa de anticorpos específicos em amostras pré colostrais de potros. Amostras de soro de 31 éguas prenhas foram avaliadas em três momentos: (1º) dois meses antes do parto; (2º) um mês antes do parto e (3º) no dia do parto. As amostras séricas dos potros foram analisadas antes da ingestão do colostro. O método RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), nos soros maternos foi realizado nas diluições 1:64 para *T. gondii*, 1:50 para *Neospora* spp. e 1:16 para *S. neurona*. Os soros pré colostrais dos potros foram avaliados sem diluição e na diluição 1:16 para os três protozoários. Nenhuma égua apresentou anticorpos para *T. gondii*. Em 19,35% das éguas, verificou-se anticorpos anti-*Neospora* spp. e 29,03% anticorpos anti-*S. neurona*. Nenhum anticorpo foi detectado nas amostras pré colostrais dos potros. Durante o período gestacional, as éguas apresentaram flutuações nos títulos de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-*S. neurona*, com maior soroprevalência no 9º mês para ambos. Neste estudo constatou a presença de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-*S. neurona* em éguas. Nos potros não foram detectados anticorpos. O monitoramento das éguas prenhas soropositivas é importante para a sanidade do animal. O capítulo II objetivou detectar os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp e *Sarcocystis neurona* em placentas equinas e líquido amniótico, e descrever lesões causadas pelos parasitas. Amostras de soro de 31 éguas prenhas foram avaliadas pelo método de RIFI como descrito anteriormente. A PCR para os três protozoários foi realizada em amostras de placentas ("pool") de 31 éguas e em 30 amostras de líquido amniótico. Para análise histológica foram coletadas quatro regiões da placenta (corno prenhe, corno não prenhe, corpo do útero e estrela cervical). Estruturas parasitárias (cistos) foram observadas em cinco placentas. Na PCR quatro amostras de placenta foram positivas para *Neospora* spp. e uma para *S. neurona*. A PCR dos líquidos amnióticos resultou em sete amostras positivas, uma para *T. gondii*, cinco para *Neospora* spp. e uma *S. neurona*. *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* foram detectados em tecidos placentários, demonstrando que estes infectam placenta equina. *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foram detectados em amostras de líquido amniótico. Sugere-se que a transmissão transplacentária de *T. gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* ocorra em éguas.

Palavras-chave: Sarcocystidae; RIFI; placenta; líquido amniótico; PCR

ABSTRACT

Infectious-parasitic diseases cause damage to horse breeding. *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* are related to neurological and reproductive diseases in horses. In horse *T. gondii* and *Neospora* spp. can be transmitted through horizontal and vertical routes. *S. neurona* causes Equine Protozoan Myeloencephalitis (EPM). There are few studies that have evaluated the presence of protozoa in mares placentas and to date, no studies have been found in samples of amniotic fluid. This dissertation had been divided into two chapters. Chapter I aimed to detect and monitor the antibodies anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora* spp. and anti-*Sarcocystis neurona* in pregnant mares and to verify the intrauterine exposure of the parasites by detecting specific antibodies in pre-colostral samples of the foals. Serum samples from 31 pregnant mares were evaluated in three moments: (1st) two months before delivery; (2nd) one month before delivery and (3rd) on the day of the birth. The serum samples from foals were analyzed before ingesting colostrum. The IFAT method (Indirect Immunofluorescence Antibody Test) in maternal serum was performed at 1:64 dilutions for *T. gondii*, 1:50 for *Neospora* spp. and 1:16 for *S. neurona*. Pre colostral serum from foals were tested pure and at 1:16 dilution for the three protozoa. No mare showed antibodies to *T. gondii*. In 19.35% of the mares were verified anti-*Neospora* spp.; and 29.03% were verified with anti-*S. neurona* antibodies. No antibodies were detected in the pre colostral samples of the foals. During the gestational period, the mares showed fluctuations in the anti-*Neospora* spp. and anti-*S. neurona*, with higher seroprevalence in the 9th month for both. This study has established the presence of anti-*Neospora* spp. and anti-*S. neurona* in mares. This study has established the presence of anti-*Neospora* spp. and anti-*S. neurona* in mares. In foals, no antibodies were detected. Monitoring of pregnant seropositive mares is important for the animal's health. Chapter II aimed to detect the protozoa *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* in equine placentas and amniotic fluid, and to describe the lesions caused by the parasites. Serum samples from 31 pregnant mares were evaluated by the IFAT method as previously described. PCR, for the three protozoans, was performed from the placental samples ("pool") of 31 mares and 30 samples of amniotic fluid. For histological analysis, four regions (pregnant horn, not pregnant horn, body of the uterus and cervical star) of the placenta were collected. Parasitic structures (cysts) were observed in five placentas. In PCR, four placenta samples were positive for *Neospora* spp., and one for *S. neurona*. The amniotic fluids PCR resulted in seven positive sample, one for *T. gondii*, five for *Neospora* spp. and a *S. neurona*. *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* were detected in placental tissues, demonstrating that these infect mares placentas. *T. gondii*, *Neospora* spp. and *S. neurona* were detected in samples of amniotic fluid. It is suggested that the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* occurs in mares.

Keywords: Sarcocystidae; IFAT; placenta; amniotic fluid; PCR

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Placenta equina (E5). A - Cisto epitelial em tecido placentário. Barra 50µm/400x, HE. B - Aumento de A. Barra 20µm/1000x, HE.....52

FIGURA 2: Placenta equina (E4). A - Dois cistos epiteliais em tecido placentário (seta). Barra 50µm/400x, HE. B - Aumento de A. Observar a parede fina do cisto. Barra 20µm/1000x, HE.....53

FIGURA 3: Placenta equina (E14). A- Cisto epitelial em tecido placentário. Barra 50µm/400x, HE. B- Aumento de A. Barra 20µm/1000x, HE.....53

FIGURA 4: Placenta equina (E15). A - Taquizoítas subdivididos. Barra 50µm/400x, HE. B - Aumento de A. Os dois taquizoítos estão quase divididos e ainda assim unidos no final da fase mitótica. Barra 20µm/1000x, HE.....53

FIGURA 5: Placenta equina (E17). A - Dois cistos (1 e 2) extra epitelial entre as vilosidades coriônicas. Barra 50µm/400x, HE. B e C - Aumento de A. A parede fina pode ser observada ao redor do centro basofílico que contém os bradizoítos. Barra 20µm/1000x, HE.....54

FIGURA 6: Produtos de amplificação de PCR da região Nc-5 com o par de primer Np21Plus/Np6Plus. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *Neospora* spp. amplificado de amostras de placentas. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixa 4: amostra positiva de “pool” placentário da égua E16; Faixa 5: amostra positiva de “pool” placentário da égua E2; Faixas 6 e 8: amostras negativas de “pool” placentário das éguas E8 e E13; Faixa 7 e 9: amostra positiva de “pool” placentário das éguas E4 e E17.....54

FIGURA 7 Produtos de amplificação de PCR da região ITS1 com o par de primers ITS1DF/ITS1DR e ITS1diF/ITS1diR. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *S. neurona* amplificado de amostra de placenta. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 10: amostras de “pool” placentário

das éguas E8, E4, E13, E17, E14, E11 e E10; Faixa 11: amostra positiva de “pool” placentário da égua E6.....55

FIGURA 8: Produtos de amplificação de PCR da região 529pb com o par de primer TOX8/TOX5 e TOX9/TOX11. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *T. gondii* amplificado de amostras de líquido amniótico. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 10: amostras de líquido amniótico das éguas E24, E15, E20, E1, E12, E26 e E27; Faixa 11: amostra positiva de líquido amniótico da égua E7; Faixas 12e 13: amostras de líquido amniótico das éguas E2 e E28.....55

FIGURA 9: Produtos de amplificação de PCR da região Nc-5 com o par de primer Np21Plus/Np6Plus e Np7/Np10. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *Neospora* spp. amplificado de amostra de líquido amniótico. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 1kb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 7: amostras positiva de líquido amniótico das éguas E5, E16, E21 e E20; Faixa 8: amostra de líquido amniótico da égua E9; Faixa 9: amostra positiva de líquido amniótico da égua E3..56

FIGURA 10: Produtos de amplificação de PCR da região ITS1 com o par de primers ITS1DF/ITS1DR e ITS1diF/ITS1diR. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *S. neurona* amplificado de amostra de líquido amniótico. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 7: amostras de líquido amniótico das éguas E24, E15, E20 e E27; Faixa 8: amostra positiva de líquido amniótico da égua E7.....56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1: Titulação de anticorpos anti IgG – <i>Neospora</i> spp. e <i>Sarcocystis neurona</i> , no 9º, 10º e 11º meses de gestação das éguas.	33
--	----

CAPÍTULO II

TABELA 1: Condições utilizadas no termociclador, sequência dos primers e tamanho dos produtos da PCR na <i>nested</i> PCR para detectar DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Sarcocystis neurona</i> na placenta equina e líquido amniótico; PCR convencional para detectar DNA para <i>Neospora</i> spp. na placenta equina e <i>nested</i> PCR para detectar DNA de <i>Neospora</i> spp. em líquido amniótico.	50
--	----

TABELA 2: Títulos de anticorpos das éguas soropositivas para <i>Neospora</i> spp e <i>S. neurona</i>	51
--	----

TABELA 3: Sequenciamento de bases nitrogenadas obtidos dos produtos de amplificação de PCR do “pool” placentário da égua E6 para <i>S. neurona</i>	57
--	----

TABELA 4: Resultados dos exames de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no “pool” placentário e no líquido amniótico para <i>T. gondii</i> , <i>Neospora</i> spp. e <i>S. neurona</i> e Exame Histopatológico das placentas de 19 éguas.	59
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

≅	- Aproximadamente
°C	- Graus Celsius
%	- Porcentagem
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
BlastN	- Basic Local Alignment Search Toll Nucleotide
cm	- Centímetro
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
g	- Força centrífuga reativa
HE	- Hematoxilina e Eosina
IgG	- Imunoglobulina G
kb	- Kilo pares de base
M	- Molar
MEP	- Mieloencefalite Protozoária Equina
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
ng	- Nanograma
n°	- Número
pb	- Par de bases
PCR	- Polymerase Chain Reaction
pmol	- Picomol
PR	- Paraná
PSI	- Puro Sangue Inglês
RIFI	- Reação de Imunofluorescência Indireta
SNC	- Sistema Nervoso Central
Taq	- <i>Thermo aquaticus</i>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Objetivo geral	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
REFERÊNCIAS	23
2 CAPÍTULO I –OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI – <i>TOXOPLASMA GONDII</i>, ANTI - <i>NEOSPORA</i> SPP. E ANTI - <i>SARCOCYSTIS NEURONA</i> EM ÉGUAS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS (PSI) E EM AMOSTRAS PRÉ COLOSTRAIS DE POTROS E MONITORAMENTO DAS ÉGUAS NO TERÇO FINAL DE GESTAÇÃO.....	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
2.1 INTRODUÇÃO	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
2.4 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
3 CAPÍTULO II – DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>, <i>NEOSPORA</i> SPP. E <i>SARCOCYSTIS NEURONA</i> EM PLACENTAS E LÍQUIDO AMNIÓTICO E HISTOLOGIA PLACENTÁRIA EM ÉGUAS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS (PSI).....	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.2.1 Animais.....	45
3.2.2 Amostras	45
3.2.3 Métodos de diagnóstico.....	46
3.3 RESULTADOS	51
3.3.1 Imunofluorescência Indireta – RIFI.....	51
3.3.2 Histopatologia.....	51
3.3.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR e sequenciamento genético	54

3.4 DISCUSSÃO	58
3.5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
4 ANEXOS	66
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA.	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem um dos maiores rebanhos de cavalos do mundo, e a equinocultura é importante fonte de renda e emprego (RIBEIRO et al., 2016). Dessa forma, enfermidades infecciosas ou infecto-parasitárias nos cavalos podem provocar grandes prejuízos para a economia do país (SPOHR et al., 2018).

Sarcocystidae é uma família de protozoários coccídios do filo Apicomplexa (IRVINE; WALKER; FRIEDRICHS, 2016). Neste grupo estão o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011).

Protozoários da família Sarcocystidae causam perdas embrionárias, mortes fetais ou nascimento de produtos inviáveis e doenças neurológicas em cavalos (SANGIONI et al., 2011; PIVOTO et al., 2014; QUEVEDO et al., 2015). Aborto e a mortalidade perinatal são uma das principais causas de perdas econômicas na criação de equinos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; MORENO et al., 2012; BORGES et al., 2017).

Toxoplasmose é uma importante zoonose com ampla distribuição (BORGES et al., 2017), acarretando em prejuízos a saúde pública e ao setor agropecuário (RIBEIRO et al., 2016). A toxoplasmose é causada pelo *T. gondii*, um protozoário intracelular obrigatório (PIVOTO et al., 2014; GENNARI et al., 2015), os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes ao *T. gondii* (CAMOSSÍ; SILVA; LANGONI, 2010; GUERRA et al., 2018).

T. gondii já foi detectado em placentas, fetos e potros, e estudos mostram que éguas soropositivas podem gerar potros soropositivos, sugerindo que a transmissão vertical pode ocorrer entre os equinos (TURNER; SARVA, 1990; ANTONELLO et al., 2016).

A transmissão vertical de *T. gondii* desempenha um papel importante na manutenção do protozoário (HIDE et al., 2009). Muitos estudos sobre a prevalência de *T. gondii* em equinos baseiam-se somente em testes sorológicos (COIRO; LANGONI; DA SILVA, 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2012; GENNARI et al., 2015; CAZAROTTO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017), sendo necessários pesquisas com a utilização de outros métodos diagnósticos, moleculares e histopatológicos, para elucidar esta via de transmissão. A relação *T. gondii* - hospedeiro em algumas

espécies pode ser complexa, resultando em infecção placentária e fetal recorrente e impactando várias gerações (SHAPIRO et al., 2015).

A neosporose equina pode causar doenças reprodutivas e/ou neurológicas em cavalos (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006). Atualmente com duas espécies descritas, *Neospora caninum* (*N. caninum*) (DUBEY et al., 1988) que tem como hospedeiro definitivo cães, coiotes (*Canis latrans*), dingos e lobos e o *Neospora hughesi* (*N. hughesi*) (MARSH et al., 1998). O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* ainda é desconhecido (BORGES et al., 2017; ANDERSON et al., 2019), porém sugere-se que pertença a família Canidae (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011).

Doenças neonatais e abortos geralmente são relacionadas a *N. caninum* (VILLALOBOS et al., 2012), e patologias neurológicas, principalmente a mieloencefalite protozoária equina (MEP) (LOCATELLI-DITTRICH; HOFFMANN; DITTRICH, 2006), ao *N. hughesi*. No entanto ambos os agentes devem ser considerados (SANGIONI et al., 2011; LASKOSKI et al., 2015). A infecção por *N. caninum* ocorre por via horizontal, pela ingestão de oocistos eliminados pelo hospedeiro definitivo, ou verticalmente por via transplacentária (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A transmissão transplacentária tem uma grande importância na disseminação de *N. caninum* em bovinos (CORBELLINI et al., 2000; PUSTERLA et al., 2011), pois a vaca permanece infectada por toda a vida e continua propagando o protozoário aos seus descendentes e assim sucessivamente por várias gerações continuamente ou intermitentemente (PIERGILI FIORETTI et al., 2003). As consequências e a importância da transmissão transplacentária em éguas ainda são desconhecidas (TOSCAN et al., 2010; ANTONELLO et al., 2012; ANDERSON et al., 2019).

Até o momento apenas dois trabalhos relataram a presença de taquizoítos de *Neospora* spp. em tecidos fetais equinos (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; ANDERSON et al., 2019).

Trabalhos que objetivaram verificar a transmissão transplacentária em equinos basearam-se nos exames sorológicos da mãe e do filho ou somente da mãe (PITEL et al., 2003; DUARTE et al., 2004; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; VILLALOBOS et al., 2006; ANTONELLO et al., 2012; PUSTERLA et al., 2014) e poucos estudos avaliaram os tecidos placentários (PUSTERLA et al., 2011; LEON et al., 2012).

Com a escassez de dados sobre *Neospora* spp. e das consequências da presença deste agente em populações equinas do Brasil, estudos são necessários para diferenciar *N. caninum* e *N. Hughesi* em cavalos e verificar a atuação desses parasitas em doenças neurológicas e falhas reprodutivas (TOSCAN et al., 2010), uma vez que, além das éguas terem um longo período gestacional e seus potros elevado valor zootécnico, *Neospora* spp. pode trazer grandes prejuízos econômicos (QUEVEDO et al., 2015).

Em éguas foram observadas eventuais flutuações nos títulos de anticorpos anti-*Neospora* spp. no soro (ANTONELLO et al., 2012), fazendo com que, os níveis de anticorpos não sejam detectados nos diferentes períodos gestacionais, quando submetido a exames sorológicos (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; HOFFMANN KORMANN et al., 2008).

O *S. neurona* é parasita intracelular obrigatório, e causa doença neurológica em cavalos (BORGES et al., 2017). Os hospedeiros definitivos de *S. neurona*, na América do Norte e do Sul são os gambás *Didelphis virginiana* e *Didelphis albiventris* respectivamente (STELMANN; AMORIM, 2010; DANGOUDOUBIYAM et al., 2011). Os equinos são hospedeiros aberrantes, sendo encontrado somente a forma assexuada do parasito nessa espécie (DUBEY et al., 2015).

S. neurona é o principal agente etiológico da mieloencefalite protozoária equina (MEP) (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011), uma doença neurológica caracterizada por alterações comportamentais e musculares (JOHNSON; BURTON; SWEENEY, 2010). A infecção também pode ser assintomática (DUBEY et al., 2015).

O diagnóstico da infecção por *S. neurona* pode ser baseado em testes sorológicos associados a achados histopatológicos, imunohistoquímicos e testes moleculares. A imunofluorescência indireta (RIFI) vem sendo utilizada com bastante frequência na detecção de anticorpos, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade (DUBEY et al., 2015), mas no Brasil registros da exposição de equinos a esse agente permanecem escassos (OLIVEIRA et al., 2017; SPOHR et al., 2018; KOCH et al., 2019; VALENÇA et al., 2019).

Por estar filogeneticamente relacionado com outros protozoários que apresentam transmissão vertical em equinos (ANTONELLO et al., 2016), *S. neurona* pode apresentar uma via semelhante de disseminação. Gray et al. (2001) levantaram a hipótese de transmissão vertical do agente ao observarem um potro de 2 meses com sinais neurológicos, sugestivo de MEP, e positivo para *S. neurona* no

Western Blot. Pitel et al. (2002) também sugeriram a possível ocorrência da transmissão do protozoário da mãe para o feto em equinos soropositivos para *S. neurona* nativos da França sem ter contato com o hospedeiro definitivo do parasita.

Atualmente somente um trabalho evidencia a exposição intra-uterina a antígenos de *Sarcocystis* spp. em equinos, com a detecção de anticorpos IgG anti-*S. neurona* em soro de potros pré-colostro (ANTONELLO et al., 2016), sendo necessários mais estudos que reforcem a importância desta via de transmissão em equinos.

As funções da placenta são vitais para o desenvolvimento fetal, sendo fundamental que ela esteja saudável para ocorrer uma gestação com sucesso e resultar em produto saudável (CARINA; MARCELA; CLAUDIA, 2015). Deve-se ressaltar que vários pontos ainda são incertos sobre a frequência da transmissão vertical dos protozoários da família Sarcocystidae em cavalos (PIVOTO et al., 2014). Assim, estudos que identifiquem os mecanismos de interação entre égua, placenta e feto são importantes para estabelecer uma adequada manutenção da gestação até o momento do parto (GUIMARÃES; MEIRELLES; FERNANDES, 2015). Ressalta-se a importância dos estudos desses protozoários, uma vez que estes podem causar perdas embrionárias, mortes fetais ou nascimento de produtos inviáveis e doenças neurológicas.

A presente dissertação está dividida em dois capítulos, o capítulo I com o título “Ocorrência de anticorpos anti – *Toxoplasma gondii*, anti - *Neospora* spp. e anti - *Sarcocystis neurona* em éguas prenhas e amostras pré colostrais de potros e monitoramento das éguas no terço final de gestação”, e o capítulo II, “Diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em placentas e líquido amniótico e histologia placentária em éguas”.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este estudo objetivou verificar a ocorrência de transmissão intra-uterina dos protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em éguas.

1.1.2 Objetivos específicos

Verificar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora* spp. e anti-*Sarcocystis neurona* em éguas prenhas da região metropolitana de Curitiba.

Verificar a exposição intra-uterina a *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona*, com a detecção dos anticorpos específicos em amostras séricas pré-colostrais dos potros.

Detectar os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona*, em amostras de placentas e de líquidos amnióticos.

Avaliar a dinâmica de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii*, anti - *Neospora* spp e anti - *Sarcocystis neurona* em éguas prenhas no terço final da gestação.

Avaliar a associação de fatores de risco para a infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em éguas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. A. et al. Histologically, immunohistochemically, ultrastructurally, and molecularly confirmed neosporosis abortion in an aborted equine fetus. **Veterinary Parasitology**, v. 270, n. April, p. 20–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.009>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3–4, p. 367–370, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.005>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. Intra-uterine exposure of horses to *Sarcocystis* spp. antigens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 271–275, 2016.
- BORGES, A. M. C. M. et al. Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses and Mules From the Northern Pantanal Wetland of Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 56, p. 19–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.04.007>>.
- 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.
- CARINA, F. G.; MARCELA, M. G.; CLAUDIA, B. F. Desenvolvimento placentário e interações materno fetais na espécie equina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 110, p. 593–594, 2015.
- CAZAROTTO, C. J. et al. Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 30–35, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.016>>.
- COIRO, C. J.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C. Epidemiological Aspects in the *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* Infection in Horses from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 620–623, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.02.008>>.
- CORBELLINI, L. G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 863–868, 2000.
- DANGOUDOUBIYAM, S. et al. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 522–524, 2011. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2722.1>>.
- DUARTE, P. C. et al. 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. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269–1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 1–42, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.026>>.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an Aborted Equine Fetus. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 5, p. 732–234, 1990.

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.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 129–132, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.023>>.

GRAY, L. C. et al. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. **Veterinary Record**, v. 149, p. 269–273, 2001.

GUERRA, N. R. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em equídeos do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 400–406, 2018.

GUIMARÃES, C. de F.; MEIRELLES, M. G.; FERNANDES, C. B. Eficiência placentária na espécie equina:Quais fatores podem estar relacionados? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 98–105, 2015.

HIDE, G. et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 136, p. 1877–1885, 2009.

HOFFMANN KORMANN, D. C. S. et al. 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.

IRVINE, K. L.; WALKER, J. M.; FRIEDRICH, K. R. Sarcocystid organisms found in bile from a dog with acute hepatitis: a case report and review of intestinal and hepatobiliary Sarcocystidae infections in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 57–65, 2016.

JOHNSON, A. L.; BURTON, A. J.; SWEENEY, R. W. Utility of 2 immunological tests for antemortem diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* infection) in naturally occurring cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1184–1189, 2010.

KOCH, M. de O. et al. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in horses, dogs and cats from Paraná state, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 2, p. 1–8, 2019.

LASKOSKI, L. M. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti *Toxoplasma gondii* antibodies in horses in the Pantanal of Mato Grosso , Brazil. **Semina**, v. 36, n. 2, p. 895–900, 2015.

LEON, A. et al. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, p.

- 179–183, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.11.001>>.
- LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of Neospora sp. and Toxoplasma gondii antibodies in mares and in precolostral foals from Paraná State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 215–221, 2006.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D. C. S.; DITTRICH, J. R. Neosporose Equina — Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 1–10, 2006.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Abortos em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul: Estudo de 72 casos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 22–26, 2012.
- MARSH, A. E. et al. Description of a new Neospora species (protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983–991, 1998.
- MORENO, B. et al. Occurrence of Neospora caninum and Toxoplasma gondii infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 312–318, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.034>>.
- OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Situação epidemiológica da infecção por Toxoplasma gondii em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 995–1000, 2012.
- OLIVEIRA, S. et al. Occurrences of antibodies against Toxoplasma gondii, Neospora spp., and Sarcocystis neurona in horses and dogs in the municipality of Pauliceia, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 277–282, 2017. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/123956>>.
- PIERGILI FIORETTI, D. et al. Neospora caninum Infection and Congenital Transmission: Serological and Parasitological Study of Cows up to the Fourth Gestation. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, n. 8, p. 399–404, 2003.
- PITEL, P.-H. et al. Detection of Sarcocystis neurona antibodies in French horses with neurological signs. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 481–485, 2002.
- PITEL, P. et al. Investigation of Neospora sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 1–6, 2003.
- PIVOTO, F. L. et al. Serological status of mares in parturition and the levels of antibodies (IgG) against protozoan family Sarcocystidae from their pre colostral foals. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 1–2, p. 107–111, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.001>>.
- PUSTERLA, N. et al. Endogenous transplacental transmission of Neospora hughesi in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 281–285, 2011.
- PUSTERLA, N. et al. Serological investigation of transplacental infection with Neospora hughesi and Sarcocystis neurona in broodmares. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 649–650, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.015>>.

- QUEVEDO, P. S. et al. Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 29–32, 2015.
- RIBEIRO, M. J. M. et al. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 142–150, 2016.
- SANGIONI, L. A. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpersvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 321–323, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000200023&lng=pt&tlng=pt>.
- SHAPIRO, K. et al. Dual congenital transmission of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* in a late-term aborted pup from a chronically infected southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **Parasitology**, v. 143, p. 276–288, 2015.
- SPOHR, K. A. H. et al. Fatores de risco associados à prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equinos de Roraima, Amazônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1337–1343, 2018.
- STELMANN, U. J. P.; AMORIM, R. M. Mioencefalite Protozoária equina. **Veterinária e zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 163–176, 2010.
- TOSCAN, G. et al. Neosporose equina: Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. e associação entre status sorológico de éguas e de suas crias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 641–645, 2010.
- TURNER, C. B.; SARVA, D. Evidence of *Toxoplasma gondii* in an equine placenta. **Veterinary Record**, v. 127, n. 4, p. 96, 1990.
- VALENÇA, S. R. F. de A. et al. Low prevalence of infection by *Sarcocystis neurona* in horses from the State of Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 298–302, 2019.
- VILLALOBOS, E. M. C. et al. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 372–375, 2006.
- VILLALOBOS, E. M. C. et al. Detection of *Neospora* sp. antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 68–70, 2012.

2 CAPÍTULO I –OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI – *Toxoplasma gondii*, ANTI - *Neospora* spp. E ANTI - *Sarcocystis neurona* EM ÉGUAS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS (PSI) E AMOSTRAS PRÉ COLOSTRAIS DE POTROS E MONITORAMENTO DAS ÉGUAS NO TERÇO FINAL DE GESTAÇÃO

RESUMO

Toxoplasma gondii, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* são protozoários coccídios e estão relacionados a doenças neurológicas e reprodutivas em equinos. A infecção ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados de *T. gondii* e *Neospora* spp., e esporocistos de *S. neurona*. A transmissão vertical de *T. gondii* e *Neospora* spp. em cavalos é importante via de transmissão e por estarem filogeneticamente relacionados sugere-se que esta via também ocorra com *S. neurona*. Informações sobre a frequência com que esta via acontece nos equinos são escassas. As consequências da infecção podem ser perdas embrionárias, mortes fetais ou nascimentos de produtos inviáveis. Para se detectar e diagnosticar a infecção são necessários testes sorológicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e moleculares. Portanto os objetivos deste estudo foram detectar e monitorar os anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora* spp. e anti-*Sarcocystis neurona* em éguas prenhas e verificar a exposição intra-uterina a *T. gondii*, *Neospora* spp., e *S. neurona*, através da detecção de anticorpos específicos no soro de potros, antes da ingestão do colostro. Para esse fim 31 éguas prenhas foram avaliadas em três momentos: (1º) dois meses antes do parto; (2º) um mês antes do parto e (3º) no dia do parto. As amostras de sangue de 31 potros foram coletadas antes da ingestão do colostro. As amostras foram submetidas a testes sorológicos utilizando o método RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta). As amostras de soro das éguas foram diluídas a 1:64 para *T. gondii*, 1:50 para *Neospora* spp. e 1:16 para *S. neurona*. As amostras de soro pré colostrais dos potros foram utilizadas puras e na diluição 1:16 para os três protozoários. Das 31 éguas avaliadas nenhuma apresentou anticorpos para *T. gondii*. Em 19,35% das éguas, verificou-se anticorpos anti-*Neospora* spp. Os anticorpos anti-*S. neurona* foram detectados em 29,03% das éguas. Nenhum anticorpo foi detectado nas amostras pré colostrais dos potros. Durante o período gestacional, as éguas apresentaram flutuações nos títulos de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-*S. neurona*, com maior soroprevalência no 9º mês para ambos. O resultado deste estudo constatou a presença de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-*S. neurona* nas éguas avaliadas. Nos potros não foram detectados anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*Neospora* spp. e anti-*S. neurona*. O acompanhamento das éguas prenhas infectadas é importante para sanidade do animal.

Palavras-chave: Sarcocystidae; protozoário; transmissão transplacentária; RIFI; soroprevalência

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* are coccidian protozoa and are related to neurological and reproductive diseases in horses. The infection occurs by ingesting water or food contaminated with sporulated oocysts of *T. gondii* and *Neospora* spp., and sporocysts of *S. neurona*. Vertical transmission of *T. gondii* and *Neospora* spp. in horses is a considerable route of transmission and because they are phylogenetically related it is suggested that this pathway also occurs with *S. neurona*. Information on the frequency with which this pathway occurs in horses is scarce. The consequences of the infection can be embryonic losses, fetal deaths or births of unviable products. To detect and diagnose the infection, serological, histopathological, immunohistochemical and molecular tests are necessary. Therefore, the objectives of this study were to detect and monitor the anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora* spp. and anti-*Sarcocystis neurona* in pregnant mares and to verify intrauterine exposure to *T. gondii*, *Neospora* spp., and *S. neurona*, by detecting specific antibodies in the foal's serum, before ingesting colostrum. For this purpose, 31 pregnant mares were evaluated at those three moments: (1st) two months before delivery; (2nd) one month before delivery and (3rd) on the day of the birth. Blood samples from the 31 foals were collected before ingesting colostrum. The samples were subjected to serological tests using the IFAT method (Indirect Immunofluorescence Antibody Test). The serum samples from the mares were diluted to 1:64 for *T. gondii*, 1:50 for *Neospora* spp. and 1:16 for *S. neurona*. The pre colostrum serum samples from foals were used pure and at 1:16 dilution for the three protozoa. Of the 31 mares evaluated, none showed antibodies to *T. gondii*. In 19.35% of the mares anti-*Neospora* spp. were verified. Anti-*S. neurona* antibodies were detected in 29.03% of the mares. No antibodies were detected in the pre colostrum samples of the foals. During the gestational period, the mares showed fluctuations in the anti-*Neospora* spp. and anti-*S. neurona*, with higher seroprevalence in the 9th month for both. The result of this study found the presence of anti-*Neospora* spp. and anti-*S. neurona* in the evaluated mares. Antibodies of Anti-*T. gondii*, anti-*Neospora* spp. and anti-*S. Neurona* were not detected in foals. The monitoring of infected pregnant mares is important for the animal's health.

Keywords: Sarcocystidae; protozoan; transplacental transmission; IFAT; seroprevalence

2.1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) são protozoários coccídios da família Sarcocystidae (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011; IRVINE; WALKER; FRIEDRICHS, 2016) que geram impactos na criação de equinos (BORGES et al., 2017) e estão associados à doenças neurológicas (PIVOTO et al., 2014) e reprodutivas (SANGIONI et al., 2011; SPOHR et al., 2018).

O *S. neurona* causa a Mieloencefalite Protozoária Equina (MEP), é caracterizada como uma doença neurológica progressiva e debilitante (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011; ANTONELLO et al., 2016), na qual os equinos são hospedeiros acidentais (RIBEIRO et al., 2016). Quadros neurológicos em cavalos também podem estar associados à infecção pelos protozoários *T. gondii* e *Neospora* spp. (BOUGHATTAS et al., 2011; SPOHR et al., 2018).

O DNA de *T. gondii* foi encontrado no sistema nervoso central (SNC) de equinos com distúrbios neurológicos (BORGES et al., 2017), mas não há evidências que *T. gondii* cause doenças neurológicas (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011). Assim como não está delineado como *Neospora caninum* (*N. caninum*) participa de distúrbios neurológicos ou falhas reprodutivas nesta espécie (ANTONELLO et al., 2012). *Neospora hughesi* (*N. hughesi*) também está associado a MEP (ANTONELLO et al., 2016), porém existem poucas informações a respeito do ciclo de vida desse parasito (OLIVEIRA et al., 2017).

Os equinos podem se infectar com *S. neurona* através da ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes dos marsupiais *Didelphis albiventris* e *Didelphis virginiana* contendo esporocistos do parasito (DUBEY et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). Oocistos esporulados de *T. gondii* e *N. caninum* são eliminados por felídeos e canídeos, respectivamente, contaminando o meio, tornando fonte de infecção para equinos (RIBEIRO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* permanece desconhecido (BORGES et al., 2017), porém sugere-se que pertença a família Canidae (DANGOUDOUBIYAM et al., 2011).

Estudos que avaliaram transmissão vertical de *T. gondii* e *Neospora* spp. em cavalos mostraram que esta via de transmissão ocorre (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; CAMOSSÍ; SILVA; LANGONI, 2010;

TOSCAN et al., 2010; PUSTERLA et al., 2011; ANTONELLO et al., 2012, 2016), porém, no Brasil, informações sobre a frequência com que esta via acontece são escassas (PIVOTO et al., 2014; SPOHR et al., 2018).

Sugere-se a transmissão vertical de *S. neurona* em equinos, visto que tal via ocorre comprovadamente em protozoários filogeneticamente relacionados (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; ANTONELLO et al., 2016). É possível observar sorologia positiva para *S. neurona* em amostras de soro pré-colostrais de potros, confirmando a exposição do potro ao protozoário (ABD-ELNAEIM et al., 2006).

O diagnóstico da infecção por protozoários pode ser baseado em testes sorológicos associados a achados histopatológicos, imunohistoquímicos e testes moleculares. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) vem sendo utilizada com bastante frequência na detecção de anticorpos, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade (DUBEY et al., 2015), sendo o principal método diagnóstico *ante mortem* da MEP (JOHNSON; BURTON; SWEENEY, 2010), pois a detecção direta do parasito é difícil antes da necropsia (ANTONELLO et al., 2015). No Brasil poucos estudos foram feitos com dados sorológicos sobre parasitas coccídeos em cavalos (BORGES et al., 2017).

Ressalta-se a importância dos estudos desses protozoários, uma vez que estes podem causar perdas embrionárias, mortes fetais ou nascimento de produtos inviáveis e doenças neurológicas, reforçando a necessidade de estudos relacionados aos parasitos na equinocultura (QUEVEDO et al., 2015).

Este estudo tem como objetivos verificar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti- *Neospora* spp. e anti-*Sarcocystis neurona* em éguas prenhas e verificar a exposição intra-uterina a *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp., e *Sarcocystis neurona*, através da detecção de anticorpos específicos no soro de potros, antes da ingestão do colostro. Avaliar a dinâmica de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii*, anti - *Neospora* spp e anti - *Sarcocystis neurona* em éguas prenhas no terço final da gestação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 31 éguas prenhas, da raça Puro Sangue Inglês (PSI) e seus respectivos potros, provenientes de três haras. Dois localizados em Piraquara - PR e um em Tijucas do Sul – Paraná.

Durante o dia as éguas eram mantidas soltas em piquetes e no período da noite recolhidas e alocadas em baias individuais.

O diagnóstico de gestação foi feito através de exame ultrassonográfico e palpação transretal após 16 dias da data da cobertura, pelo veterinário responsável de cada propriedade. As coletas de sangue das éguas prenhas foram realizadas em três momentos: (1º) dois meses antes da data prevista do parto; (2º) um mês antes da data prevista para o parto e (3º) no dia do parto. As coletas de sangue dos potros foram realizadas logo após o parto, antes da ingestão do colostro. Todos os partos foram assistidos.

As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular, previamente desinfetadas com álcool 70%, utilizando-se sistema de colheita a vácuo, sendo coletado, em média, 5mL de sangue de cada animal em tubos sem anticoagulante. Para a obtenção do soro as amostras foram centrifugadas a 1300g por 5 minutos. Após centrifugação o soro foi mantido congelado a -20° C até a realização das análises.

Os testes sorológicos para *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foram realizados pelo método de RIFI, conforme descrito por Duarte et al. (2003) e Locatelli-Dittrich et al. (2006). As lâminas foram preparadas com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, NC1 de *N. caninum*, e merozoítos da cepa SN37R de *S. neurona*.

As cepas foram produzidas *in vitro* no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. As amostras de soro das éguas foram diluídas em 1:64 para *T. gondii*, 1:50 para *Neospora* spp., e 1:25 para *S. neurona*. Para as amostras de soro pré colostrais dos potros foram utilizados puro (sem diluição) e na diluição 1:16 para os três protozoários. Utilizou-se o conjugado Anti-Horse IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) como anticorpo secundário a uma diluição de 1:100. A leitura foi em microscópio de imunofluorescência com fonte de luz ultravioleta (Olympus, Tokyo, Japan). Os soros controle positivos e negativos para *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foram incluídos em todas as lâminas. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência periférica total dos taquizoítos e merozoítos, e negativas as amostras que não tiveram fluorescência ou apresentaram fluorescência apical. Amostras de soro positivas foram submetidas a titulação dos anticorpos pela RIFI para a determinação do título máximo da reação.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR, sob protocolo nº 078/2018.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 31 éguas avaliadas para *T. gondii* nenhuma apresentou anticorpos anti – *T. gondii* na titulação 1:64. Outros trabalhos, também utilizando a RIFI e ponto de corte de 1:64, realizados em diferentes municípios brasileiros revelaram prevalências que variaram de 0,9% a 32,18% (COIRO; LANGONI; DA SILVA, 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2012; GENNARI et al., 2015; CAZAROTTO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). As diferenças nas taxas de anticorpos provavelmente ocorreram devido à amostragem realizada, as condições ambientais, técnicas sorológicas, interpretações dos resultados, época em que as amostras foram coletadas e presença de felídeos (VARDELEON et al., 2001; JOHNSON; BURTON; SWEENEY, 2010; OLIVEIRA FILHO et al., 2012).

Os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes ao *T. gondii* (CAMOSSO; SILVA; LANGONI, 2010), com infecção geralmente inaparente (OLIVEIRA FILHO et al., 2012), o que pode justificar a ausência de anticorpos observada neste estudo.

Anticorpos anti – *Neospora* spp. foram detectados em 19,35% (6/31) das éguas utilizando como ponto de corte a diluição 1:50 (Tabela 1), considerado o ponto de corte mais adequado para rastreamento dos animais que são desafiados por *Neospora* spp. (ANTONELLO et al., 2012). Resultados similares foram observados por Sangioni et al. (2011) e Villalobos et al. (2012), em equinos do Sul do país, com prevalência de 15,9% e 14,4%, respectivamente. Outros estudos verificaram prevalências superiores de quase 50% ou mais de éguas soropositivas para *Neospora* spp., na titulação 1:50 (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; ANTONELLO et al., 2012; QUEVEDO et al., 2015). Esta diferença de resultados observada pode ter ocorrido devido a variação da cepa parasitária e resposta imune dos animais testados (JOHNSON; BURTON; SWEENEY, 2010).

TABELA 1: Titulação de anticorpos anti IgG – *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona*, no 9º, 10º e 11º meses de gestação das éguas.

Éguas	Titulação					
	<i>Neospora</i> spp.			<i>S. neurona</i>		
	9º mês	10º mês	11º mês	9º mês	10º mês	11º mês
E1	1:400	-	-	-	-	-
E2	-	-	1:50	-	-	-
E3	-	1:50	-	-	-	-
E4	1:50	1:50	-	-	-	-
E5	1:50	1:50	-	1:25	1:50	1:50
E6	1:50	-	-	1:25	-	-
E7	-	-	-	-	1:50	-
E8	-	-	-	-	-	1:50
E9	-	-	-	-	-	1:50
E10	-	-	-	1:25	-	-
E11	-	-	-	-	1:25	-
E12	-	-	-	1:25	-	-
E13	-	-	-	1:25	-	-

LEGENDA: (-) : reação negativa.

Os testes de RIFI foram realizados com antígenos de *N. caninum*, porém as éguas podem estar reagindo contra o *N. hughesi* (GONDIM; LINDSAY; MCALLISTER, 2009), uma vez que não é possível diferenciar *N. caninum* e *N. hughesi* sorologicamente (FINNO; ALEMAN; PUSTERLA, 2007), por existir reação cruzada entre essas duas espécies (VILLALOBOS et al., 2012; QUEVEDO et al., 2015).

Nos casos de neosporose equina o agente etiológico é o *N. hughesi* (FINNO; ALEMAN; PUSTERLA, 2007; SANGIONI et al., 2011), e a infecção natural por *N. hughesi* só foi relatada em cavalos (MARSH et al., 1998). Reforçando que as éguas desse estudo possam estar infectadas com *N. hughesi*, sendo necessário testes adicionais com antígenos específicos para verificar qual a espécie que realmente circula nesta população. Deve-se ressaltar que essas amostras devem ser submetidas a PCR (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006).

Com os resultados dos testes sorológicos sugere-se que *Neospora* spp. está circulando na população estudada e que mais estudos são necessários para identificar as espécies de *Neospora* spp. que infectaram esses animais, uma vez que o ciclo de vida e biologia de *N. hughesi* e sua interação com os cavalos permanece pouco esclarecida (PUSTERLA et al., 2011).

Os anticorpos anti – *S. neurona* foram detectados em 29,03% (9/31) das éguas, na diluição 1:25. Na titulação 1:50 reduziu para 12,90% (4/31) de éguas reativas para *S. neurona*, sendo está a máxima titulação observada.

A prevalência de conversão para *S. neurona* nas éguas deste trabalho, foi inferior ao apresentado por Antonello et al. (2015) que relataram 33,86%, utilizando o mesmo método diagnóstico em éguas prenhas no estado do Rio Grande do Sul. Spohr et al. (2018) observaram uma prevalência de 43,2% também utilizando o método de RIFI, porém em cavalos do estado de Roraima.

Estudos realizados nos Estados Unidos mostram que cerca de 45% a 55% da população de cavalos tenham entrado em contato em algum momento da sua vida com o *S. neurona* (COOK et al., 2001), prevalência que não foi observada neste estudo.

A soro conversão contra *S. neurona* é utilizada para diagnosticar a MEP (JOHNSON; BURTON; SWEENEY, 2010), sendo a sorologia a principal ferramenta de diagnóstico *ante mortem* da MEP (ANTONELLO et al., 2015). Além dos testes sorológicos serem seguros para diagnóstico de *S. neurona*, em equinos, por não apresentarem reação cruzada com *N. hughesi* (QUEVEDO et al., 2015), outro agente identificado como causador de MEP (PACKHAM et al., 2002; PITEL et al., 2003).

Anticorpos anti - *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* não foram encontrados em nenhuma amostra pré colostrar dos potros. Quando anticorpos anti – *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* forem detectados nas amostras pré colostrais, sugere-se a ocorrência de infecção intra-uterina, pois potros recém nascidos que não tenham ingerido o colostro são agamaglobulinêmicos (JEFFCOTT, 1975; LEBLANC, 1990; ANTONELLO et al., 2012) devido a placenta equina ser do tipo epiteliocorial difusa, não ocorrendo a transferência de imunoglobulina maternas para o feto (CHUCRI et al., 2010; PIVOTO et al., 2012). A presença de anticorpos nos soros de potros recém-nascidos, que não tenham ingerido o colostro, sugere infecção na sua vida uterina (ABD-ELNAEIM et al., 2006; QUEVEDO et al., 2015), e

que os anticorpos foram produzidos pelo seu sistema imune (ANTONELLO et al., 2012).

No presente estudo, os potros descendentes de éguas soropositivas, foram soronegativos. Outros estudos também verificaram que nem sempre éguas soropositivas geram potros congenitamente infectados (QUEVEDO et al., 2015), porém, a transmissão vertical de *Neospora* spp. e *T. gondii* ocorre em éguas (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; CAMOSSO; SILVA; LANGONI, 2010; PUSTERLA et al., 2011; ANTONELLO et al., 2012).

Alguns estudos estão demonstrando a possibilidade de ocorrer transmissão vertical de *S. neurona* em equinos. Gray et al. (2001) relataram o caso de um potro com dois dias de idade, que apresentou sinais compatíveis com a MEP e no método de *Western blot* foi positivo para *S. neurona* no líquido, sugerindo que a infecção foi intra-uterina.

No estado do Rio Grande do Sul, pela primeira vez, foi relatada a presença de anticorpos anti-*S. neurona* pela técnica de RIFI, em 14 potros recém nascidos, antes da ingestão do colostro (ANTONELLO et al., 2016), sendo eliminada a possibilidade da transferência passiva de anticorpos das éguas para seus potros (COOK et al., 2001), sugerindo a possibilidade da transmissão vertical de *S. neurona* em equinos (ANTONELLO et al., 2016).

Durante o período gestacional, as éguas apresentaram flutuações dos títulos de anticorpos (Tabela 1). Para o ponto de corte de 1:50 para *Neospora* spp., verificou-se que o 9º mês apresentou maior soroprevalência e o 11º mês a menor. Hoffmann Kormann et al. (2008) observaram maior soroprevalência no 8º mês, sugerindo que avaliações em éguas sejam feitas no 8º e 9º mês de gestação, para *Neospora* spp.

Quando avaliada a presença de anticorpos anti – *S. neurona* na diluição 1:25, foi observado maior prevalência no 9º mês. Isso sugere que o melhor período para detectar anticorpos anti – *Neospora* spp. e anti - *S. neurona* é o 9º mês de gestação. Não foram encontrados outros trabalhos que avaliaram a soroprevalência de *S. neurona* nos diferentes meses em éguas gestantes.

O modo como ocorrem essas flutuações em éguas permanece desconhecida, mas sugere-se que esteja relacionado com o estado imunológico da mãe (WILLIAMS et al., 2009; ANDERSON et al., 2019).

2.4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que as éguas foram expostas aos protozoários *Neospora* spp. e *S. neurona* no Paraná. Nos potros não foram detectados anticorpos anti - *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona*. Possivelmente os potros não entraram em contato com os protozoários na fase intra-uterina.

Os exames sorológicos para *Neospora* spp. e *S. neurona* em éguas prenhas devem ser realizados no 8º e 9º mês de gestação para monitorar a sanidade das fêmeas gestantes.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELNAEIM, M. M. M. et al. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Science Direct**, v. 27, p. 1103–1113, 2006.
- ANDERSON, J. A. et al. Histologically, immunohistochemically, ultrastructurally, and molecularly confirmed neosporosis abortion in an aborted equine fetus. **Veterinary Parasitology**, v. 270, n. April, p. 20–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.009>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. The importance of vertical transmission of Neospora sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3–4, p. 367–370, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.005>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. Investigação de anticorpos contra Sarcocystis neurona e Sarcocystis cruzi em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p. 1465–1468, 2015.
- ANTONELLO, A. M. et al. Intra-uterine exposure of horses to Sarcocystis spp. antigens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 271–275, 2016.
- BORGES, A. M. C. M. et al. Antibodies Against Sarcocystis neurona, Neospora spp., and Toxoplasma gondii in Horses and Mules From the Northern Pantanal Wetland of Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 56, p. 19–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.04.007>>.
- BOUGHATTAS, S. et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection among horses in Tunisia. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 218, p. 1–3, 2011. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/218>>.
- 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.
- CAZAROTTO, C. J. et al. Horses seropositive for Toxoplasma gondii, Sarcocystis spp. and Neospora spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 30–35, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.016>>.
- CHUCRI, T. M. et al. **A review of immune transfer by the placenta** **Journal of Reproductive Immunology** Elsevier Ireland Ltd, , 2010. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.08.062>>.
- COIRO, C. J.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C. Epidemiological Aspects in the Leptospira spp. and Toxoplasma gondii Infection in Horses from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 620–623, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.02.008>>.
- COOK, A. G. et al. Interpretation of the detection of Sarcocystis neurona antibodies in the serum of young horses. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 187–195, 2001.
- DANGOUDOUBIYAM, S. et al. Detection of antibodies against Sarcocystis neurona, Neospora spp., and Toxoplasma gondii in horses from Costa Rica. **Journal of**

Parasitology, v. 97, n. 3, p. 522–524, 2011. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2722.1>>.

DUARTE, P. C. et al. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 8–13, 2003.

DUBEY, J. P. et al. An update on Sarcocystis neurona infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 1–42, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.026>>.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. Neospora caninum (Apicomplexa) in an Aborted Equine Fetus. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 5, p. 732–234, 1990.

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.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of antibodies against Toxoplasma gondii and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 129–132, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.023>>.

GONDIM, L. F. P.; LINDSAY, D. S.; MCALLISTER, M. M. Canine and bovine Neospora caninum control sera examined for cross-reactivity using Neospora caninum and Neospora hughesi indirect fluorescent antibody tests. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 86–88, 2009.

GRAY, L. C. et al. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. **Veterinary Record**, v. 149, p. 269–273, 2001.

HOFFMANN KORMANN, D. C. S. et al. 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.

IRVINE, K. L.; WALKER, J. M.; FRIEDRICH, K. R. Sarcocystid organisms found in bile from a dog with acute hepatitis: a case report and review of intestinal and hepatobiliary Sarcocystidae infections in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 57–65, 2016.

JEFFCOTT, L. B. The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 23, n. 23, p. 727–733, 1975.

JOHNSON, A. L.; BURTON, A. J.; SWEENEY, R. W. Utility of 2 immunological tests for antemortem diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis (Sarcocystis neurona infection) in naturally occurring cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1184–1189, 2010.

LEBLANC, M. M. Immunologic considerations. In: KOTERBA. **Equine Clinical Neonatology**, p. 275–294, 1990.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of Neospora sp. and Toxoplasma gondii antibodies in mares and in precolostral foals from Paraná State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 215–221, 2006.

MARSH, A. E. et al. Description of a new Neospora species (protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983–

991, 1998.

OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 995–1000, 2012.

OLIVEIRA, S. et al. Occurrences of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp., and *Sarcocystis neurona* in horses and dogs in the municipality of Pauliceia, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 277–282, 2017. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/123956>>.

PACKHAM, A. E. et al. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1239–1246, 2002.

PITEL, P. et al. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 1–6, 2003.

PIVOTO, F. L. et al. Anticorpo anti-*Neospora* spp. em amostras sorológicas de potro pré-colotais pela técnica de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1061–1064, 2012.

PIVOTO, F. L. et al. Serological status of mares in parturition and the levels of antibodies (IgG) against protozoan family Sarcocystidae from their pre colostrum foals. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 1–2, p. 107–111, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.001>>.

PUSTERLA, N. et al. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 281–285, 2011.

QUEVEDO, P. S. et al. Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 29–32, 2015.

RIBEIRO, M. J. M. et al. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 142–150, 2016.

SANGIONI, L. A. et al. 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. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000200023&lng=pt&tlng=pt>.

SPOHR, K. A. H. et al. Fatores de risco associados à prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equinos de Roraima, Amazônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1337–1343, 2018.

TOSCAN, G. et al. Neosporose equina: Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. e associação entre status sorológico de éguas e de suas crias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 641–645, 2010.

VARDELEON, D. et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 273–282, 2001.

VILLALOBOS, E. M. C. et al. Detection of *Neospora* sp. antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**

Veterinária, v. 21, n. 1, p. 68–70, 2012.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v. 136, p. 1895–1900, 2009.

3 CAPÍTULO II – DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *TOXOPLASMA GONDII*, *NEOSPORA* SPP. E *SARCOCYSTIS NEURONA* EM PLACENTAS E LÍQUIDO AMNIÓTICO E HISTOLOGIA PLACENTÁRIA EM ÉGUAS DA RAÇA PURO SANGUE INGLÊS (PSI)

RESUMO

O Brasil tem um dos maiores rebanhos de cavalos do mundo. Dessa forma, enfermidades infecciosas ou infecto-parasitárias podem provocar grandes prejuízos na criação de equinos do país. A família Sarcocystidae tem como principais representantes os protozoários *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) e estão associados a doenças neurológicas e reprodutivas em cavalos. A transmissão vertical de *T. gondii* em equinos pode ocorrer em cavalos. Em cavalos a transmissão de *Neospora* spp. ocorre pelas vias horizontal e vertical (via transplacentária). No entanto, sua constatação em equinos é pouco relatada. Sugere-se que esta via também ocorra com o protozoário *S. neurona*, por ter semelhança com *T. gondii* e *Neospora* spp. A placenta é um órgão fundamental para o desenvolvimento fetal, mas até o momento poucos estudos verificaram protozoários em tecidos placentários e não existem trabalhos que avaliam a presença destes protozoários no líquido amnióticos em animais. Os objetivos do presente estudo foram: (1) detectar os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em placentas de éguas, por exames histopatológicos e moleculares; (2) descrever as lesões causadas pelos parasitas e (3) detectar por métodos moleculares os protozoários nas amostras de líquido amniótico. Amostras de sangue e placenta foram coletados de 31 éguas prenhas. Amostras de líquido amniótico foram coletadas de 30 éguas prenhas. As éguas foram identificadas como E1 até E31. As amostras de soro foram submetidas a testes sorológicos, utilizando o método RIFI, com as seguintes diluições: 1:64 para *T. gondii*; 1:50 para *Neospora* spp.; e 1:16 para *S. neurona*. As placentas foram submetidas a análises histológicas e PCR. Das 31 éguas avaliadas, nenhuma apresentou anticorpos anti-*T. gondii*. Em 19,35% das éguas, constataram-se anticorpos anti-*Neospora* spp. e em 29,03% das éguas foram detectados anticorpos anti-*S. neurona*. Nas placentas, estruturas parasitárias (cistos) foram observadas em cinco animais (E4, E5, E13, E14 e E15). Na PCR, duas amostras de placenta (E2 e E16) foram positivas para *Neospora* spp. e uma (E6) para *S. neurona*. Na PCR dos líquidos amnióticos uma amostra (E7) foi positiva para *T. gondii*, cinco amostras (E3, E5, E16, E20, E21) foram positivas para *Neospora* spp. e uma amostra (E7) foi positiva para *S. neurona*. Das oito éguas que apresentaram PCR positiva duas eram soropositivas para *Neospora* spp., uma para *S. neurona*, duas apresentaram soroconversão para *Neospora* spp. e *S. neurona*, e três não apresentaram sorologia positiva para nenhum dos três protozoários estudados. Os protozoários *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* foram detectados em tecidos placentários, demonstrando que estes protozoários infectam placentas de éguas. *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foram detectados em amostras de líquido amniótico. Sugere-se que a transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* ocorre em cavalos.

Palavras-chave: PCR, cavalo; protozoários; transmissão vertical; DNA

ABSTRACT

Brazil has one of the largest herds of horses in the world. In this way, infectious or infectious-parasitic diseases can cause great damage in the country's horse breeding and maintaining. The Sarcocystidae family has as main representatives the protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) and are associated with neurological and reproductive diseases in horses. Vertical transmission of *T. gondii* in horses can occur. In horses, the transmission of *Neospora* spp. occurs through the horizontal and vertical pathways (transplacental pathway). However, its finding in horses is rarely reported. It is suggested that this pathway also occurs with the protozoan *S. neurona*, because it is similar to *T. gondii* and *Neospora* spp. The placenta is a fundamental organ for fetal development, but so far few studies have found protozoa in placental tissues and there are no studies that assess the presence of these protozoa in amniotic fluid in animals. The objectives of the present study were: (1) to detect the protozoa *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* in mares placentas, by histopathological and molecular exams; (2) describe the lesions caused by the parasites and (3) detect the protozoa in the samples of amniotic fluid by molecular methods. Samples of blood and placenta were collected from 31 pregnant mares. Samples of amniotic fluid from 30 pregnant mares were collected, labeled from E1 to E31. The serum samples were subjected to serological tests, using the IFAT method, with the following dilutions: 1:64 for *T. gondii*; 1:50 for *Neospora* spp.; and 1:16 for *S. neurona*. The placentas were subjected to histological and PCR analysis. Of the 31 mares evaluated, none showed anti-*T. gondii* antibodies. In 19.35% of the mares *Neospora* spp. antibodies were found; and in 29.03% of the mares, anti-*S. neurone* antibodies were detected. In the placentas, parasitic structures (cysts) were observed in five animals (E4, E5, E13, E14 and E15). In PCR, two samples of placenta (E2 and E16) were positive for *Neospora* spp. and one (E6) for *S. neurona*. In PCR of amniotic fluids, one sample (E7) was positive for *T. gondii*, five samples (E3, E5, E16, E20, E21) were positive for *Neospora* spp. and one sample (E7) was positive for *S. neurona*. Of the eight mares that presented positive PCR, two were seropositive for *Neospora* spp., one for *S. neurona*, two presented seroconversion for *Neospora* spp. and *S. neurona*, and three did not show positive serology for any of the three protozoa studied. The protozoa *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* were detected in placental tissues, demonstrating that these protozoa infect mares' placentas. *T. gondii*, *Neospora* spp. and *S. neurona* were detected in samples of amniotic fluid. It is suggested that the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* occurs in horses.

Keywords: PCR, horse; protozoa; vertical transmission; DNA

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem um dos maiores rebanhos de cavalos do mundo, e a equinocultura é importante fonte de renda e emprego (RIBEIRO et al., 2016). Dessa forma, enfermidades infecciosas ou infecto-parasitárias nos cavalos podem provocar grandes prejuízos para a economia do país (SPOHR et al., 2018).

Os equinos são hospedeiros em potencial para a família Sarcocystidae (IRVINE; WALKER; FRIEDRICH, 2016) que tem como principais representantes, os protozoários *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) e estão associados a doenças neurológicas e reprodutivas em cavalos (SANGIONI et al., 2011; PIVOTO et al., 2014; SPOHR et al., 2018) gerando impactos na criação (BORGES et al., 2017).

A infecção por *T. gondii* não causa doenças graves, mas em fêmeas podem ocorrer problemas reprodutivos como o aborto (SHAAPAN et al., 2012). *T. gondii* já foi detectado em placentas, e estudos mostram que éguas soropositivas podem gerar potros soropositivos, sugerindo que a transmissão vertical pode ocorrer entre os equinos (TURNER; SARVA, 1990; PIVOTO et al., 2014).

A transmissão vertical de *T. gondii* desempenha um papel importante na manutenção do protozoário (HIDE et al., 2009). Rejmanek et al. (2010) demonstraram em camundongos que a transmissão vertical poderia ocorrer ao longo de várias gerações, no qual animais infectados na vida intra-uterina transmitem para os seus descendentes direto o *T. gondii*.

A transmissão transplacentária de *T. gondii* em pequenos ruminantes é considerada a forma mais grave de transmissão e geralmente ocorre na fase aguda da infecção (MORAES et al., 2010), comprometendo o desenvolvimento embrionário (MESQUITA et al., 2019) e causando necrose placentária (FTHENAKIS et al., 2015).

Neospora spp. identificado pela primeira vez no final do século passado, é um parasita intracelular obrigatório, com capacidade de formar cistos em seus hospedeiros intermediários (QUEVEDO et al., 2015). Apresenta o *Neospora caninum* (*N. caninum*) e *Neospora hughesi* (*N. hughesi*) como representantes (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; MARSH et al., 1998).

A neosporose equina pode causar doenças reprodutivas e/ou neurológicas em cavalos. Doenças neonatais e abortos geralmente são relacionadas com

infecção por *N. caninum* (VILLALOBOS et al., 2012), e patologias neurológicas, principalmente a mieloencefalite protozoária equina (MEP) relacionadas ao *N. hughesi* (LOCATELLI-DITTRICH; HOFFMANN; DITTRICH, 2006; ANTONELLO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

A transmissão de *N. caninum* em cavalos ocorre horizontalmente, pela ingestão de alimentos e/ou água contaminada com oocistos do protozoário ou verticalmente pela via transplacentária (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; BORGES et al., 2017).

A transmissão transplacentária tem uma grande importância na disseminação de *N. caninum* em bovinos (CORBELLINI et al., 2000; PUSTERLA et al., 2011). Por outro lado, em equinos esse meio de infecção foi comprovado recentemente por Pusterla et al. (2011), em potros na Califórnia infectados com *N. hughesi*. Poucos trabalhos relataram a ocorrência desta via (DUBEY; PORTERFIELD, 1990; ANDERSON et al., 2019), permanecendo pouco relatada a importância do modo de transmissão transplacentária de *Neospora* spp. em cavalos.

Sarcocystis neurona (*S. neurona*) é um coccídio (IRVINE; WALKER; FRIEDRICH, 2016) considerado o principal agente etiológico da mieloencefalite protozoária equina (MEP), uma doença neurológica na qual os cavalos participam como hospedeiros acidentais (RIBEIRO et al., 2016).

O diagnóstico da infecção por *S. neurona* pode ser baseado em testes sorológicos associados a achados histopatológicos, imunohistoquímicos e testes moleculares (FURR et al., 2002; DUBEY et al., 2015).

Por terem semelhança com outros protozoários que apresentaram transmissão transplacentária (ANTONELLO et al., 2016), e trabalhos indicarem que a infecção intra-uterina por *S. neurona* ocorre em mamíferos (BARBOSA et al., 2015), sugere-se que esta via também ocorra em equinos.

Estudos sugerem a ocorrência de infecção congênita de *S. neurona* na espécie equina (GRAY et al., 2001; PITEL et al., 2002), e atualmente um estudo realizado com éguas e seus potros avaliando a presença de anticorpos anti – *S. neurona*, evidenciou, pela primeira vez, a ocorrência de infecção congênita em cavalos (ANTONELLO et al., 2016).

A placenta é um órgão fundamental para o desenvolvimento fetal, a qual precisa estar saudável para que a gestação ocorra tranquilamente, gerando um produto saudável (CARINA; MARCELA; CLAUDIA, 2015). Até o momento, poucos

estudos buscaram protozoários em tecidos placentários (PUSTERLA et al., 2011; LEON et al., 2012) e não existem trabalhos que avaliam a presença destes protozoários em líquido amniótico em animais. Na medicina hoje o método PCR tornou-se o exame de escolha para o diagnóstico de infecção fetal por *T. gondii* em mulheres (SILVA et al., 2019).

Os objetivos do presente estudo foram: (1) detectar os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em placentas de éguas, por exames histopatológicos e moleculares; (2) descrever as lesões causadas pelos parasitas e (3) detectar por métodos moleculares os protozoários nas amostras de líquido amniótico.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram selecionadas 31 éguas, da raça Puro Sangue Inglês (PSI), provenientes de três haras. Dois localizados em Piraquara - PR e um em Tijucas do Sul – PR. O diagnóstico de gestação foi realizado pelo médico veterinário responsável de cada propriedade. Durante o dia as éguas eram mantidas soltas em piquetes e no período da noite recolhidas e alocadas em baias individuais. Todos os partos foram assistidos. As éguas foram identificadas com a letra “E” seguida de algarismos arábicos de 1 a 31.

No momento da realização do experimento todas as éguas apresentavam-se clinicamente saudáveis, porém as propriedades têm histórico de aborto e MEP.

3.2.2 Amostras

3.2.2.1 Sangue

As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular, previamente desinfetadas com álcool 70%, utilizando-se sistema de colheita a vácuo, sendo coletado, em média, 5mL de sangue de cada animal em tubos sem anticoagulante. Para a obtenção do soro as amostras foram centrifugadas a 1300g por 5 minutos.

Após centrifugação o soro foi mantido congelado a – 20° C até a realização do exame sorológico.

3.2.2.2 Placenta

As amostras de 31 placentas foram coletadas após o parto e expulsão espontânea completa. Fragmentos de 1 a 3cm de diâmetro foram coletados em triplicata, em quatro regiões distintas: corno prenhe, corno não prenhe, corpo do útero e estrela cervical (PUSTERLA et al., 2011), totalizando 372 fragmentos de placenta. As amostras foram acondicionadas e fixadas em formalina 10% tamponada para análise histopatológica e *in natura* em microtubos de 1,5mL e armazenadas na temperatura de -20°C para extração do DNA e realização de diagnóstico molecular - PCR.

3.2.2.3 Líquido amniótico

Amostras de líquido amniótico foram coletadas de 30 éguas, durante a segunda fase do parto, quando o âmnion estava projetado na região da vulva da égua. As amostras foram coletadas em seringas de 5,0 mL e agulhas 30x0,8mm. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em tubos e mantidos congelados a – 20° C para posterior análise.

3.2.3 Métodos de diagnóstico

3.2.3.1 Imunofluorescência Indireta - RIFI

Os testes sorológicos para *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* foram realizados pelo método de RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), conforme descrito por Duarte et al. (2004) e Locatelli-Dittrich et al., (2006) As lâminas foram preparadas com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, NC1 de *N. caninum*, e merozoitos da cepa SN37R de *S. neurona*.

As cepas foram produzidas *in vitro* no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. As amostras de soro das éguas foram diluídas em 1:64 para *T. gondii*, 1:50 para *Neospora* spp., e 1:25 para *S. neurona*. Utilizou-se o conjugado Anti-Horse IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) como

anticorpo secundário a uma diluição de 1:100. A leitura foi em microscópio de imunofluorescência com fonte de luz ultravioleta (Olympus, Tokyo, Japan). Os soros controle positivos e negativos para *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foram incluídos em todas as lâminas. Foram consideradas positivas as amostras com fluorescência periférica total dos taquizoítos e merozoítos, e negativas as amostras que não tiveram fluorescência ou com fluorescência apical. Amostras de soro positivas foram submetidas a titulação dos anticorpos pela RIFI para a determinação do título máximo da reação.

3.2.3.2 Histopatologia – processo tecidual, coloração e exame microscópico

As 31 placentas foram examinadas macroscopicamente logo após o parto e mantidas refrigeradas, por até duas horas, até o momento da coleta das amostras. Os fragmentos de quatro locais diferentes (corno prenhe, corno não prenhe, corpo do útero e estrela cervical) foram imersos em solução de formalina tamponada 10% para fixação.

Após a fixação, os fragmentos foram transferidos para cassetes histológicos. O processamento histológico foi realizado em processador automatizado de tecidos. Após processado foi realizado o emblocamento dos materiais. Os blocos foram cortados em seções de $5\mu m$. A coloração de rotina, hematoxilina e eosina (HE), foi utilizada para o estudo histopatológico (descrição de possíveis lesões) e para observação das estruturas parasitárias (cistos, taquizoítos e bradizoítos), nos aumentos de 400x e 1000x, no microscópio óptico DM500 (Leica, Wetzlar, Germany). Foram analisados 372 cortes histológicos. Os principais locais de pesquisa foram os epitélios no córion e as vilosidades coriônicas.

3.2.3.3 Extração de DNA da placenta

Para o processo de extração, foram retiradas porções similares das diferentes regiões placentárias coletadas (corno prenhe, corno não prenhe, corpo do útero e estrela cervical) e maceradas em gral com auxílio de pistilo, formando um “pool” placentário. Totalizando 31 “pools”.

A extração de DNA dos 31 “pools” placentários foi realizada com o Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Depois de realizada a extração, o DNA obtido foi mantido a – 20°C. A quantificação de DNA foi realizada no aparelho “NanoDrop One” (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR.

3.2.3.4 Extração de DNA do líquido amniótico

Para a extração do DNA, o líquido amniótico foi inicialmente centrifugado por 10 minutos a 1600g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso com 300 µL de tampão de lise nuclear (Tris 0,2 mM, pH 8,2, NaCl 40 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8,0) (YANG et al., 2015). Após este pré preparo a extração foi realizada com o “Kit Indimag Pathogen” (Indical, San Francisco, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Depois da extração, o DNA obtido foi mantido a – 20°C. A quantificação de DNA foi realizada no aparelho “NanoDrop One” (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR.

3.2.3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético

A reação de amplificação das sequências de DNA foram realizadas utilizando *nested* PCR para *T. gondii* e *S. neurona* com primers específicos (Tabela 1) que amplificam a região 529pb de *T. gondii* e ITS1 de *S. neurona* conforme metodologia descrita por Su & Dubey, (2009) e Wünschmann et al. (2009). Para detectar o DNA de *Neospora* spp. nas placentas foi utilizado PCR convencional com pares de primers específicos (Tabela 1) conforme metodologia descrita por Rocchigiani et al. (2017). Para detectar o DNA de *Neospora* spp. no líquido amniótico foi utilizado *nested* PCR com primers específicos (Tabela 1) conforme metodologia descrita por Alipour; Rahimi; Shakerian, 2018.

O volume final da reação de amplificação do DNA de *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foi de 25µL, contendo 80ng de DNA, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP, 1U/µL de Taq polymerase, 1X buffer, 0.5pmol de primers e água ultrapura.

As amostras de *T. gondii*, *S. neurona* das placentas e líquidos amnióticos, e de *Neospora* spp. do líquido amniótico foram submetidas a um segundo ciclo da *nested* PCR (Tabela 1), utilizando 1µL do produto da primeira amplificação e adicionados a um volume final de 25µL contendo 80ng de DNA, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP, 1U/µL de Taq polymerase, 1X buffer, 0.5pmol de primers. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4% com marcadores de 100 pb e 1kb Plus DNA Ladder – 250µg (1,0µL) (Invitrogen, CA, USA), corado com Safer (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e observado no transiluminador de ultravioleta e documentado por fotografia. Amostras controle positivo de DNA de *T. gondii* (cepa RH), *N. caninum* (cepa NC-1) e *S. neurona* (cepa SN37R) e controle negativo (água ultrapura) foram incluídas em todas as reações.

Os produtos das reações de PCR foram purificados enzimaticamente com Exol/SAP (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). Os produtos de PCR purificados foram marcados com BigDye v3.1 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) para marcação com terminadores fluorescentes. Os produtos marcados foram precipitados com 20% de acetato de amônio 7,5M e três volumes de etanol absoluto, e re-suspensos em 10 µL de HiDi-formamida. Essas amostras foram sequenciadas em Genetic Analyser 3500xL (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), utilizando capilares de 50cm com polímero Pop7 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa “Sequencing Analysis” v5.4 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA).

O sequenciamento foi submetido a análise no BlastN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*) utilizando o banco de dados do GenBank no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para confirmação das sequencias amplificadas.

TABELA 1: Condições utilizadas no termociclador, sequência dos primers e tamanho dos produtos da PCR na *nested* PCR para detectar DNA de *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis neurona* na placenta equina e líquido amniótico; PCR convencional para detectar DNA para *Neospora* spp. na placenta equina e *nested* PCR para detectar DNA de *Neospora* spp. em líquido amniótico.

Protozoário	Região alvo (Local)	Condições do termociclador para realização da PCR	Sequência de primers	Tamanho dos produtos da PCR
<i>T. gondii</i>	529pb	Primeira amplificação Desnaturação inicial a 95°C por 300s 30 ciclos: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 60s e extensão a 72°C por 120s. Extensão final a 72°C por 300s	TOX8: GACGTCTGTGTACGTAGACCTAAG TOX5: CTGCAGACACAGTGCATCTGGATT	450pb
<i>T. gondii</i>	529pb	Segunda amplificação Desnaturação inicial a 95°C por 300s 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 60s e extensão a 72°C por 60s. Extensão final a 72°C por 300s	TOX9: AGGAGAGATATCAGGACTGTAG, TOX11: GCGTCGTCTCGTCTAGATCG	162pb
<i>Neospora</i> spp.	Nc-5	Desnaturação inicial a 95°C por 300s 40 ciclos: desnaturação a 94°C por 60s, anelamento a 63°C por 60s e extensão a 74°C por 210s. Extensão final a 74°C por 600s	Np21plus: CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC Np6plus: CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	337pb
<i>S. neurona</i>	ITS1	Primeira amplificação Desnaturação inicial a 94°C por 180s 35 ciclos: desnaturação a 95°C por 40s, anelamento a 58°C por 40s e extensão a 72°C por 90s. Extensão final a 72°C por 300s	ITS1DF: TACCGATTGAGTGTTCGGTG ITS1DR: GCAATTCACATTGCGTTTCGC	≈1600pb
<i>S. neurona</i>	ITS1	Segunda amplificação Desnaturação inicial a 94°C por 180s 35 ciclos: Desnaturação a 95°C por 40s, anelamento a 58°C por 40s e extensão a 72°C por 90s. Extensão final a 72°C por 300s	ITS1diF: CGTAACAAGGTTTCCGTAGG ITS1diR: TTCATCGTTGCGGAGCCAAG	≈870pb
<i>Neospora</i> spp.	Nc-5	Primeira amplificação Desnaturação inicial a 94°C por 300s 35 ciclos: desnaturação a 95°C por 45s, anelamento a 64°C por 45s e extensão a 72°C por 45s. Extensão final a 72°C por 300s	Np21plus: CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC Np6plus: CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	328pb
<i>Neospora</i> spp.	Nc-5	Segunda amplificação Desnaturação inicial a 94°C por 300s 35 ciclos: desnaturação a 95°C por 45s, anelamento a 64°C por 45s e extensão a 72°C por 45s. Extensão final a 72°C por 300s	Np7: GGGTGAACC- GAGGGAGTTG Np10: TCGTCCGCTTGCTCCCTATGAAT	198pb

(SU; DUBEY, 2009; WÜNSCHMANN et al., 2009; ROCCHIGIANI et al., 2017; ALIPOUR; RAHIMI; SHAKERIAN, 2018)

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR, sob protocolo nº 078/2018.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Imunofluorescência Indireta – RIFI

Das 31 éguas avaliadas pelo método de imunofluorescência indireta nenhuma apresentou anticorpos do tipo IgG sérico anti - *T. gondii* na titulação 1:64.

Os anticorpos anti – *Neospora* spp. foram detectados em 19,35% (6/31) das éguas utilizando como ponto de corte a diluição 1:50 e anticorpos anti – *S. neurona* foram detectados em 29,03% (9/31) das éguas, na diluição 1:25 reduzindo para 12,90% quando avaliadas na titulação de 1:50 (Tabela 2). Foi observada co-infecção anti – *Neospora* spp. e *S. neurona* em duas amostras, nas éguas E5 e E6.

TABELA 2: Títulos de anticorpos das éguas soropositivas para *Neospora* spp e *S. neurona*.

Éguas	Titulação	
	<i>Neospora</i> spp.	<i>S. neurona</i>
E1	1:400	-
E2	1:50	-
E3	1:50	-
E4	1:50	-
E5	1:50	1:50
E6	1:50	1:25
E7	-	1:50
E8	-	1:50
E9	-	1:50
E10	-	1:25
E11	-	1:25
E12	-	1:25
E13	-	1:25

LEGENDA: (-): reação negativa.

3.3.2 Histopatologia

Macroscopicamente não foram observadas alterações nas placentas. Quando avaliadas por microscopia de luz todas as amostras apresentaram congestão difusa e áreas multifocais de degeneração hidrópica das células epiteliais coriônicas. A hiperplasia também estava distribuída de maneira multifocal nas

amostras. Nas placentas de dois animais (E18 e E19) foi observado infiltrado inflamatório de neutrófilos nos capilares coriônicos e no lúmen do tecido, mas estruturas parasitárias não foram observadas. Fato também observado por Mesquita et al. (2018) ao estudar lesões placentárias em cabras associadas a aborto por *N. caninum*. Pazinato et al. (2016) observaram em éguas que placentas sem alterações macroscópicas podem apresentar infiltrados inflamatórios e gerar potros saudáveis corroborando com os achados desse estudo.

Estruturas parasitárias (Figuras 1 a 5) foram observadas nas placentas de cinco animais (16,12%), E4, E5, E14, E15 e E17. Cistos epiteliais foram observados na placenta da égua E5 (Figura 1), positiva na RIFI para *Neospora* spp. e *S. neurona*, e negativa para ambos os protozoários na PCR da placenta. Cistos também foram observados na amostra de placenta da égua E4 (Figura 2), que também apresentaram anticorpos anti-*Neospora* spp., e nas placentas das éguas E14 e E15 (Figura 3 e 4) ambas negativas na RIFI e PCR quando avaliadas para os três protozoários. Além disso, foram observados cistos extra epitelial na placenta da égua E17 (Figura 5), soronegativa para os três protozoários e na PCR da placenta foi positiva para *Neospora* spp. Os cistos eram envoltos por uma cápsula delicada e bem definida que limitava uma área central basofílica com bradizoítos muito pequenos (SHAPIRO et al., 2015). Seu tamanho era comparável ao tamanho dos núcleos epiteliais.

FIGURA 1: Placenta equina (E5). A - Cisto epitelial em tecido placentário. Barra 50µm/400x, HE. B - Aumento de A. Barra 20µm/1000x, HE.

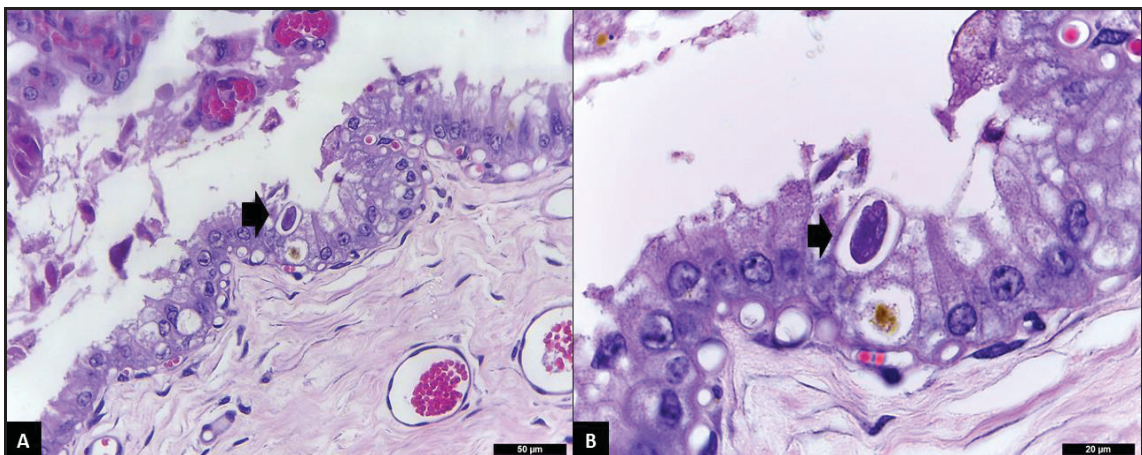


FIGURA 2: Placenta equina (E4). A - Dois cistos epiteliais em tecido placentário (seta). Barra 50µm/400x, HE. B - Aumento de A. Observar a parede fina do cisto. Barra 20µm/1000x, HE.

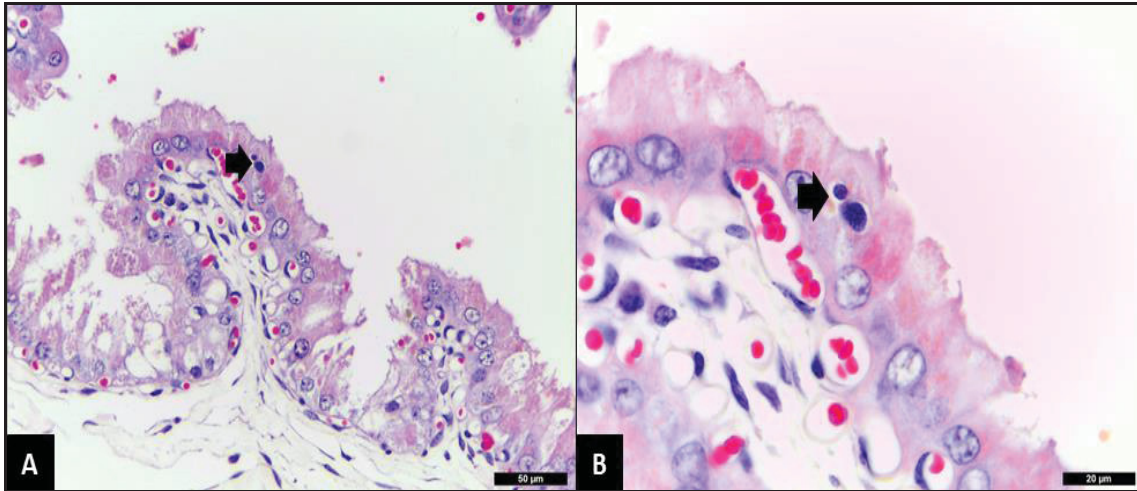


FIGURA 3: Placenta equina (E14). A- Cisto epitelial em tecido placentário. Barra 50µm/400x, HE. B- Aumento de A. Barra 20µm/1000x, HE.

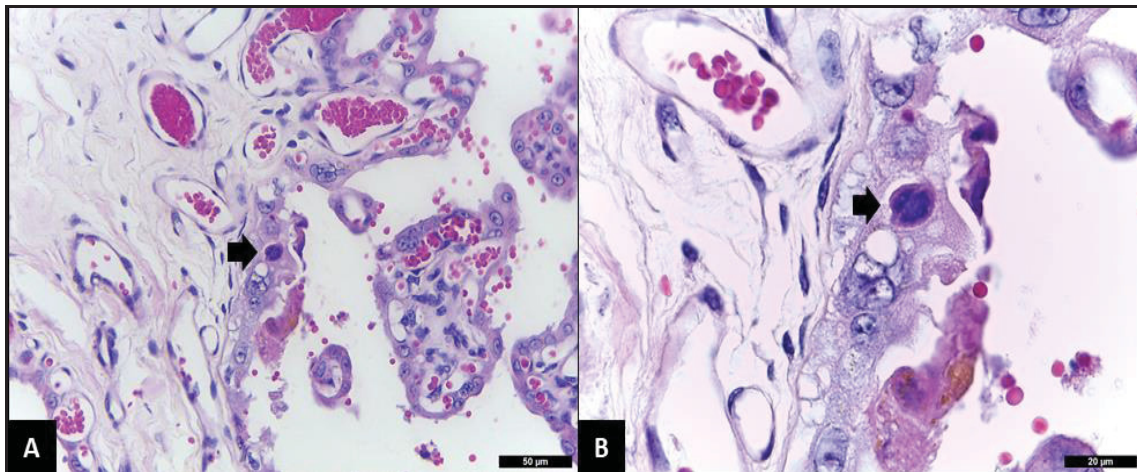


FIGURA 4: Placenta equina (E15). A - Taquizoítas subdivididos. Barra 50µm/400x, HE. B - Aumento de A. Os dois taquizoítas estão quase divididos e unidos. Barra 20µm/1000x, HE.

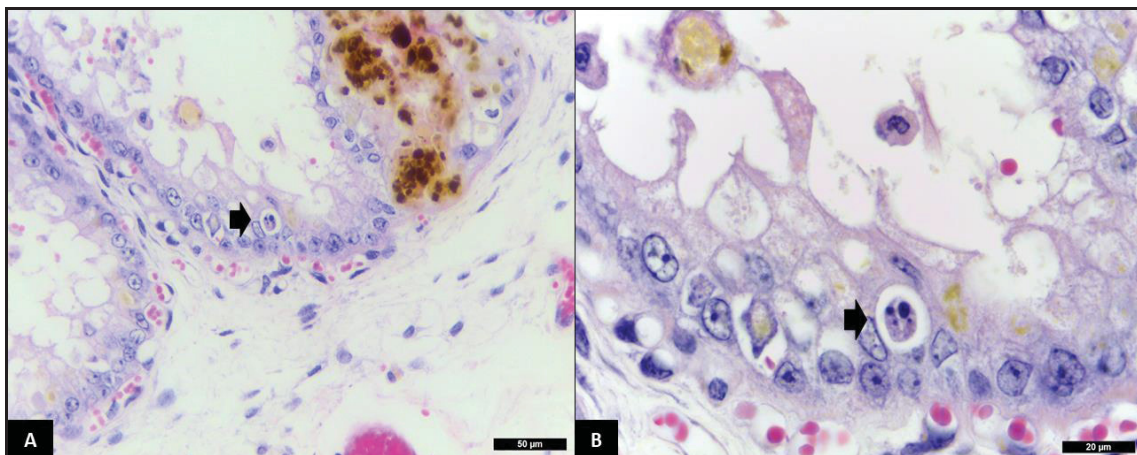
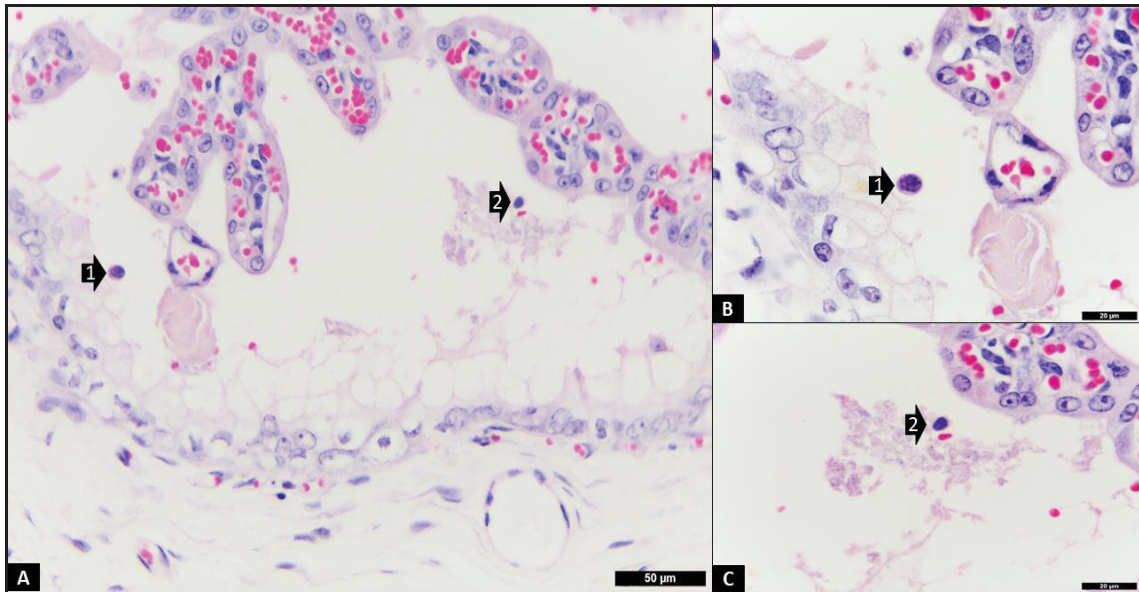


FIGURA 5: Placenta equina (E17). A - Dois cistos (1 e 2) extra epitelial entre as vilosidades coriônicas. Barra 50µm/400x, HE. B e C - Aumento de A. A parede fina pode ser observada ao redor do centro basofílico que contém os bradizoítos. Barra 20µm/1000x, HE.



3.3.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR e sequenciamento genético

A *nested* PCR para as 31 amostras de placenta foram negativas para *T. gondii*. Na PCR convencional os pares de primers Np21Plus/Np6Plus permitiram amplificar fragmentos em quatro amostras de placenta equina (E2, E4, E16 e E17) (Figura 6). A *nested* PCR foi positiva em somente uma amostra (E6) (3,23% -1/31) avaliando a região ITS1 de *S. neurona* (Figura 7).

FIGURA 6: Produtos de amplificação de PCR da região Nc-5 com o par de primer Np21Plus/Np6Plus. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *Neospora* spp. amplificado nas amostras de placentas. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixa 4: amostra positiva de “pool” placentário da égua E16; Faixa 5: amostra positiva de “pool” placentário da égua E2; Faixas 6 e 8: amostras negativas de “pool” placentário das éguas E8 e E13; Faixa 7 e 9: amostra positiva de “pool” placentário das éguas E4 e E17.

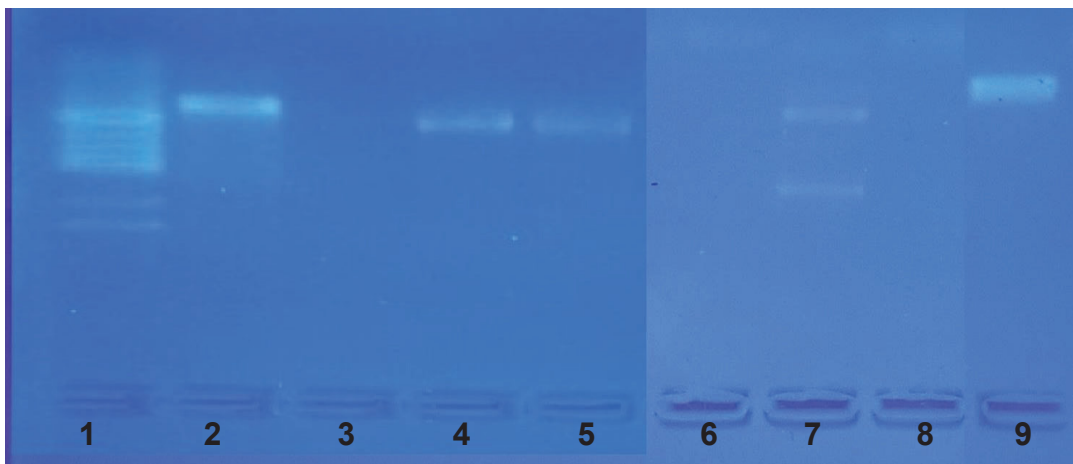


FIGURA 7 Produtos de amplificação de PCR da região ITS1 com o par de primers ITS1DF/ITS1DR e ITS1diF/ITS1diR. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *S. neurona* amplificado de amostra de placenta. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 10: amostras de “pool” placentário das éguas E8, E4, E13, E17, E14, E11 e E10; Faixa 11: amostra positiva de “pool” placentário da égua E6.



Das 30 amostras de líquido amniótico, 29 (96,67%) foram negativas para *T. gondii*, 25 (83,33%) para *Neospora* spp. e 29 (96,67%) para *S. neurona*.

A *nested* PCR de uma amostra do líquido amniótico (E7) foi positiva para *T. gondii* (Figura 8). Na *nested* PCR para *Neospora* spp. foram amplificados fragmentos em cinco amostras de líquido amniótico (E3, E5, E16, E20 e E21) (Figura 9).

A amostra E7 foi positiva na *nested* PCR para *S. neurona* (Figura 10).

FIGURA 8: Produtos de amplificação de PCR da região 529pb com o par de primer TOX8/TOX5 e TOX9/TOX11. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *T. gondii* amplificado de amostras de líquido amniótico. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 10: amostras de líquido amniótico das éguas E24, E15, E20, E1, E12, E26 e E27; Faixa 11: amostra positiva de líquido amniótico da égua E7; Faixas 12 e 13: amostras de líquido amniótico das éguas E2 e E28.



FIGURA 9: Produtos de amplificação de PCR da região Nc-5 com o par de primer Np21Plus/Np6Plus e Np7/Np10. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *Neospora* spp. amplificado de amostra de líquido amniótico. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 1kb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 7: amostras positiva de líquido amniótico das éguas E5, E16, E21 e E20; Faixa 8: amostra de líquido amniótico da égua E9; Faixa 9: amostra positiva de líquido amniótico da égua E3.

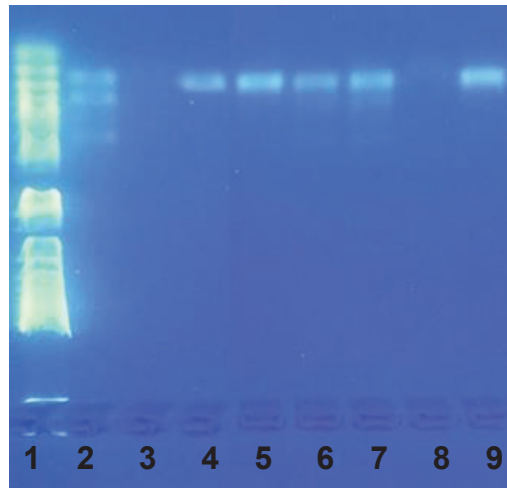
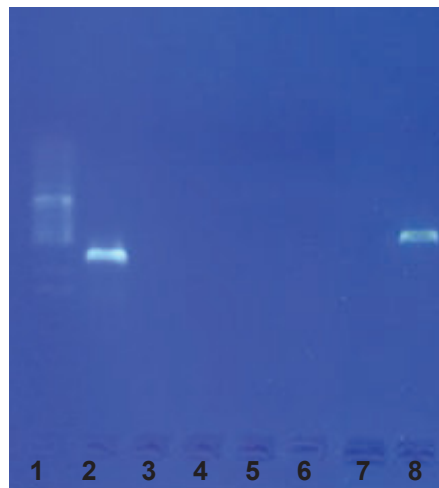


FIGURA 10: Produtos de amplificação de PCR da região ITS1 com o par de primers ITS1DF/ITS1DR e ITS1diF/ITS1diR. Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com Safer®, indicando presença do DNA de *S. neurona* amplificado de amostra de líquido amniótico. Faixa 1: Marcador Molecular Ladder 100pb plus DNA; Faixa 2: controle positivo; Faixa 3: controle negativo; Faixas 4 a 7: amostras de líquido amniótico das éguas E24, E15, E20 e E27; Faixa 8: amostra positiva de líquido amniótico da égua E7.



Foi obtida uma sequência (Tabela 3) do produto de amplificação da região ITS1 da amostra de “pool” placentário da égua (E6) compatível com *Sarcocystis neurona* (99%).

TABELA 3: Sequenciamento de bases nitrogenadas obtidos dos produtos de amplificação de PCR do “pool” placentário da égua E6 para *S. neurona*.

Égua	Sequenciamento das bases nitrogenadas
E6	TCCTGTTTTCTTTAAACCCATTTCAACCCATTGAATCCCCCAATACATGAGCCGGTGATGACGTC TTCCTGGGGTGAACCTGTCCAAGCTTCA TTGTCGCCCTTGGATGCTATGATGAACCTTGGAGAGGTTTCGTCGTGCGGGGAGTTATCATCATCGTGTTCATGCGTATGTTTTCTGT GGAAGGGAAGGGGGGTTAGTAGTGGTACCTAGAAGTACTAGTGTGCTCACCCACCATCCTTTTCCACATGAGAAATCATAACGCAT GAGGAAGGAGGAGGGCCACCCTGTTATATTATAATCGCGCTAAACATGCTGCGTCAATGAGTTACCCGGGATGATGTCGTCAAGGGTAT CATGATGATGATGTTGGTGTGGTTTTATAATATGAAGGCGTGTGGGTC TTTCCCTTCTGAGAAATTAGGGTGAAGCCAGGGATCTGATGA TGATAAAAGATATACAGGCTGTCCACATGTAGAGAGTAGAACGTTCTCTTGTGTGCCCCACACATGGTACATGTTCAAAAATGAACCGT GTCTATGTGTGAGGTACGTGCATGTGCGGTTGTTACCCCTTCTTTGGCCGCTTTTATCGTCAGCAATCCTTCGGCATCCCTCCCTTTT YTTTTTTTTTCCCACACTGATTTTTTTTCAATTGAGCGGGAAGGGTGGGTGTCAGCAGCGGCGACTGACTTCGTTTATCTTGTTCGGAAAACT GCTATGACAGCCGCAC TTAGACAGCGGACGTACTCTTTGAGTATGCGGTGTGCGGTGGTAATGGCAGTAGATGAATGAAGAAGGAG AAGGAGGTATGCCCGTACTGCTTACATCTTAGCACACCCCTTTGCCCTCGTTGTAATCGTTCGAGTGGAAAAACAGTTG

3.4 DISCUSSÃO

Nos exames sorológicos (RIFI) para *T. gondii*, das 31 éguas avaliadas para *T. gondii* nenhuma apresentou anticorpos anti – *T. gondii*. Outros trabalhos em diferentes municípios brasileiros revelaram prevalências que variaram de 0,9% a 32,18% (COIRO; LANGONI; DA SILVA, 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2012; GENNARI et al., 2015; CAZAROTTO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Estudos mostram que a soroprevalência tem relação com a região estudada (VALENÇA et al., 2015), pois diferentes condições ambientais favorecem a esporulação do oocisto de *T. gondii*, aumentando as chances da contaminação de alimentos, água e solo e consequentemente do animais (VILLENA et al., 2012).

Na nested PCR para *T. gondii* não foram obtidos produtos de amplificação em nenhum “pool” placentário, porém em uma amostra de líquido amniótico (E7) foi observado amplificação do DNA de *T. gondii*. Estudos mostram que em diferentes tecidos de um mesmo animal é possível detectar ou não o DNA de *T. gondii* pelo método de PCR, sugerindo que a quantidade de DNA presente no tecido estudado seja baixa ou que o parasita não esteja presente na amostragem coletada (PAPINI et al., 2015), o que pode ter acontecido neste estudo.

Os equinos estão entre as espécies domésticas mais resistentes ao *T. gondii* (CAMOSSI; SILVA; LANGONI, 2010), com infecção geralmente inaparente (OLIVEIRA FILHO et al., 2012; GENNARI et al., 2015) o que pode justificar a ausência de anticorpos e/ou DNA de *T. gondii*.

Na amostra de soro da égua E6 foram detectados anticorpos anti – *S. neurona* e a PCR da placenta foi positiva para o mesmo agente (Tabela 4). No exame histológico não foram observados cistos na placenta.

Nas éguas E2, E3 e E4 foram detectados anticorpos anti - *Neospora* spp. e a PCR também foi positiva para o mesmo protozoário no líquido amniótico da égua E3 e nas placentas das éguas E2 e E4. Avaliações histológica as vezes não permitem a detecção de cistos e/ou taquizoitos de forma precisa (VAN MAANEN et al., 2004). Anderson et al. (2019) tiveram dificuldade na identificação dos protozoários em lâminas histológicas de placentas e outros tecidos fetais. O mesmo foi observado por Mesquita et al. (2018) em cabras naturalmente infectadas por *N. caninum*, demonstrando que a frequência de visualização do parasito é baixa.

TABELA 4: Resultados dos exames de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no “pool” placentário e no líquido amniótico para *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* e Exame Histopatológico das placentas de 19 éguas.

Égua	<i>T. gondii</i>			<i>Neospora</i> spp.			<i>S. neurona</i>			Exame Histopatológico
	RIFI	PCR “pool” placentário	PCR líquido amniótico	RIFI	PCR “pool” placentário	PCR líquido amniótico	RIFI	PCR “pool” placentário	PCR líquido amniótico	
E1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
E4	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
E5	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
E6	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
E7	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
E8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E13	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E16	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
E17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
E20	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

LEGENDA: (+) positivo; (-) negativo

No presente estudo a égua E1 apresentou resultado positivo na sorologia para *Neospora* spp. porém quando realizado PCR da placenta e líquido amniótico foi negativa. Na análise histológica não foi observado lesões ou presença de cistos (Tabela 4).

Seis éguas (E8, E9, E10, E,11, E12 e E13) apresentaram sorologia para *S. neurona* e nas PCRs os resultados foram negativos (Tabela 4). Nas análises histológicas não foram observadas lesões ou presença de cistos. Pusterla et al. (2011) avaliaram a transmissão transplacentária de *N. hughesi* em éguas e observaram que nove apresentaram sorologia positiva e somente uma placenta foi positiva para o parasita na PCR. Resultados que podem ser explicados pelo tipo de tecido coletado, a região coletada, baixas concentrações do parasitas, relação parasita-hospedeiro, que depende da virulência da cepa, tempo de exposição, biologia do parasita, estado imunológico do animal (GRAY et al., 2001; DUARTE et al., 2004; SHAPIRO et al., 2015). Fato este que também já foi observado em outros estudos com protozoários da família Sarcocystidae (SHAAPAN et al., 2012; MESQUITA et al., 2018; ANDERSON et al., 2019).

As amostras de soro das éguas E14, E15, E16 e E17 foram negativas para os três protozoários na RIFI, porém na PCR da placenta duas (E16 e E17) amostras foram positivas para *Neospora* spp. e uma (E16) foi positiva para *Neospora* spp. na PCR do líquido amniótico. Em três (E14, E15 e E17) foi possível observar cistos na placenta, no exame histopatológico (Tabela 4). As coletas de sangue das éguas foram realizadas provavelmente na fase inicial da infecção, não havendo anticorpos detectáveis, uma vez que a soro conversão ocorre em torno de 26 dias após infecção (CUTLER et al., 2001).

Amostras de quatro regiões diferentes em triplicata da placenta foram coletadas para maximizar as chances da presença dos parasitas na amostra, porém foi observada diferença nos resultados entre PCR e histopatologia de três éguas (E14, E15 e E16). Sugere-se que na amostragem obtida para os diferentes testes ocorreu ou não a presença do parasita. Fato observado na leitura das lâminas histológicas em diferentes cortes da mesma placenta, nas quais foram observadas estruturas delimitadas por uma cápsula delicada e bem definida eosinofílica que limitava uma área central basofílica com taquizoítos, sugestivo de *Neospora* spp. Esteban-Redondo et al. (1999) em estudos com infecção experimental com *T. gondii*

também observaram diferenças nos resultados da PCR e histologia em análises de cérebro e coração de ovinos.

Das 31 amostras analisadas na RIFI duas (E5 e E6) apresentaram co-infecção para *Neospora* spp. e *S. neurona*. Reação cruzada pode ocorrer entre táxons próximos filogeneticamente (ROSSANO et al., 2002). A PCR pode ser um método diagnóstico auxiliar nestes casos. Na égua E6 observou-se reação positiva na nested PCR do “pool” placentário para *S. neurona* e a mesma amostra não amplificou DNA para *Neospora* spp. sugerindo que a infecção esteja ocorrendo por *S. neurona*. Na égua E5 foi possível amplificar DNA de *Neospora* spp. em amostra de líquido amniótico, sugerindo que a infecção esteja ocorrendo por *Neospora* spp. e o cisto observado no exame histológico também seja deste protozoário.

A PCR foi positiva para *Neospora* spp. em duas amostras de líquidos amnióticos (E20 e E21), porém quando realizados os outros exames (RIFI, PCR da placenta e exame histológico) não foram observados anticorpos, amplificação de DNA nem presença de cistos na placenta. Sugerindo que as coletas de sangue tenham ocorrido na fase inicial da infecção, por isso a ausência de anticorpos (CUTLER et al., 2001), e que nas amostras coletadas para PCR da placenta e lâminas histológicas não havia presença do parasita.

Até o presente, não foram encontrados estudos com diagnóstico molecular, por PCR, para *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* em amostras de líquido amniótico de éguas. O presente estudo é o primeiro a realizar o diagnóstico sorológico nas éguas, monitorar os partos e detectar os parasitas em placentas e líquidos amnióticos de éguas saudáveis, sem histórico de abortos.

3.5 CONCLUSÃO

Os protozoários *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* foram detectados em tecidos placentários, demonstrando que estes protozoários infectam tecidos placentários de éguas. *T. gondii*, *Neospora* spp. e *S. neurona* foram detectados em amostras de líquido amniótico.

Os resultados sugerem que a transmissão transplacentária de *T. gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* ocorre em cavalos.

REFERÊNCIAS

- ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, p. 1–8, 2018.
- ANDERSON, J. A. et al. Histologically, immunohistochemically, ultrastructurally, and molecularly confirmed neosporosis abortion in an aborted equine fetus. **Veterinary Parasitology**, v. 270, n. April, p. 20–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.009>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. Intra-uterine exposure of horses to *Sarcocystis* spp. antigens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 271–275, 2016.
- BARBOSA, L. et al. A novel *Sarcocystis* neurona genotype XIII is associated with severe encephalitis in an unexpectedly broad range of marine mammals from the northeastern Pacific Ocean. **Journal of Parasitology Research**, v. 45, n. 0, p. 595–603, 2015.
- BORGES, A. M. C. M. et al. Antibodies Against *Sarcocystis* neurona, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses and Mules From the Northern Pantanal Wetland of Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 56, p. 19–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.04.007>>.
- 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.
- CARINA, F. G.; MARCELA, M. G.; CLAUDIA, B. F. Desenvolvimento placentário e interações materno fetais na espécie equina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 110, p. 593–594, 2015.
- CAZAROTTO, C. J. et al. Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 30–35, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.016>>.
- COIRO, C. J.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C. Epidemiological Aspects in the *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* Infection in Horses from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 620–623, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.02.008>>.
- CORBELLINI, L. G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 863–868, 2000.
- CUTLER, T. J. et al. Immunoconversion against *Sarcocystis* neurona in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 197–210, 2001.
- DUARTE, P. C. et al. 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. et al. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 1–42, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.026>>.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an Aborted Equine Fetus. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 5, p. 732–234, 1990.

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.

ESTEBAN-REDONDO, I. et al. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 155–171, 1999.

FTHENAKIS, G. C. et al. Veterinary Parasitology Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 56–66, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.017>>.

FURR, M. et al. Clinical Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM). **Journal VeterJournal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 618–621, 2002.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 129–132, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.023>>.

GRAY, L. C. et al. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. **Veterinary Record**, v. 149, p. 269–273, 2001.

HIDE, G. et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 136, p. 1877–1885, 2009.

IRVINE, K. L.; WALKER, J. M.; FRIEDRICH, K. R. Sarcocystid organisms found in bile from a dog with acute hepatitis: a case report and review of intestinal and hepatobiliary Sarcocystidae infections in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 57–65, 2016.

LEON, A. et al. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, p. 179–183, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.11.001>>.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Paraná State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 215–221, 2006.

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

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983–991, 1998.

MESQUITA, E. P. et al. Imunodeteção de *Toxoplasma gondii* em tecido placentário

de cabras naturalmente infectadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 1, p. 86–92, 2019.

MESQUITA, L. P. et al. Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum* 1. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 444–449, 2018.

MORAES, E. P. B. X. et al. Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 36–41, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.07.001>>.

OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 995–1000, 2012.

OLIVEIRA, S. et al. Occurrences of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp., and *Sarcocystis neurona* in horses and dogs in the municipality of Pauliceia, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 277–282, 2017. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/123956>>.

PAPINI, R. A. et al. Seroprevalence and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Horses Slaughtered for Human Consumption in Italy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 8, p. 657–661, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jjevs.2015.06.012>>.

PAZINATO, F. M. et al. Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 665–670, 2016.

PITEL, P.-H. et al. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 481–485, 2002.

PIVOTO, F. L. et al. Serological status of mares in parturition and the levels of antibodies (IgG) against protozoan family Sarcocystidae from their pre colostrum foals. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 1–2, p. 107–111, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.001>>.

PUSTERLA, N. et al. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 281–285, 2011.

QUEVEDO, P. S. et al. Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 29–32, 2015.

REJMANEK, D. et al. Congenital Transmission of *Toxoplasma gondii* in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) After Oral Oocyst Infection. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 516–520, 2010.

RIBEIRO, M. J. M. et al. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 142–150, 2016.

ROCCHIGIANI, G. et al. *Neospora caninum* in Wild Waterfowl: Occurrence of

- Parasite DNA and Low antibody titers. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 142–145, 2017.
- ROSSANO, M. G. et al. Cross-sectional study of serum antibodies against *Sarcocystis neurona* in cats tested for antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 4, p. 511–514, 2002.
- SANGIONI, L. A. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpersvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 321–323, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000200023&lng=pt&tlng=pt>.
- SHAAPAN, R. M. et al. PCR and serological assays for detection of *Toxoplasma gondii* infection in sport horse in Cairo, Egypt. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 158–165, 2012.
- SHAPIRO, K. et al. Dual congenital transmission of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* in a late-term aborted pup from a chronically infected southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **Parasitology**, v. 143, p. 276–288, 2015.
- SILVA, B. C. T. et al. Toxoplasmose Congênita: Estratégias De Controle Durante O Pré-Natal. **Cadernos da Medicina**, v. 2, n. 1, p. 16–26, 2019. Disponível em: <<http://www.revista.unifeso.edu.br/index.php/cadernosdemedicinaunifeso/article/view/1086/572>>.
- SPOHR, K. A. H. et al. Fatores de risco associados à prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equinos de Roraima, Amazônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1337–1343, 2018.
- Su, C.; Dubey, J.P. *Toxoplasma*. In: Dongyou L. **Molecular Detection of Foodborne pathogens**. London, UK. Taylor and Francis, p. 741-753, 2009.
- VALENÇA, S. R. de A. F. et al. Risk Factors for Occurrence of Anti-*Neospora* spp. Antibodies in Horses From Alagoas, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 11–12, p. 917–921, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.08.014>>.
- VAN MAANEN, C. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 351–364, 2004.
- VILLALOBOS, E. M. C. et al. Detection of *Neospora* sp. antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 68–70, 2012.
- VILLENA, I. et al. New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 203–208, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.001>>.
- WÜNSCHMANN, A. et al. *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 2, p. 283–287, 2009.

4 ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 078/2018, referente ao projeto “Transmissão vertical de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* em éguas”, sob a responsabilidade Rosângela Locatelli Dittrich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 07/11/2018.

Vigência do projeto	Dezembro/2018 até Fevereiro/2020
Espécie/Linhagem	<i>Equus caballus</i> (equino)/PSI
Número de animais	70
Peso/Idade	45 – 500 kg/Variável
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Haras particulares da região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 078/2018, regarding the project “Vertical transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in equines” under Rosângela Locatelli Dittrich supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 07/11/2018.

Duration of the project	December/2018 until February/2020
Specie/Line	<i>Equus caballus</i> (equine)/PSI
Number of animals	70
Weight/Age	45 – 500 kg/Variável
Sex	Male and female
Origin	Horse breeding farm private of the Curitiba metropolitan region, Paraná, Brazil

Curitiba, 07 de novembro de 2018

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

REFERÊNCIAS

- ABD-ELNAEIM, M. M. M. et al. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Science Direct**, v. 27, p. 1103–1113, 2006.
- ALIPOUR, M.; RAHIMI, E.; SHAKERIAN, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in different types of raw milk and traditional dairy product samples. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 6, p. 1–8, 2018.
- ANDERSON, J. A. et al. Histologically, immunohistochemically, ultrastructurally, and molecularly confirmed neosporosis abortion in an aborted equine fetus. **Veterinary Parasitology**, v. 270, n. April, p. 20–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.009>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3–4, p. 367–370, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.005>>.
- ANTONELLO, A. M. et al. Investigação de anticorpos contra *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis cruzi* em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p. 1465–1468, 2015.
- ANTONELLO, A. M. et al. Intra-uterine exposure of horses to *Sarcocystis* spp. antigens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 271–275, 2016.
- BARBOSA, L. et al. A novel *Sarcocystis neurona* genotype XIII is associated with severe encephalitis in an unexpectedly broad range of marine mammals from the northeastern Pacific Ocean. **Journal of Parasitology Research**, v. 45, n. 0, p. 595–603, 2015.
- BORGES, A. M. C. M. et al. Antibodies Against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in Horses and Mules From the Northern Pantanal Wetland of Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 56, p. 19–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.04.007>>.
- BOUGHATTAS, S. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among horses in Tunisia. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 218, p. 1–3, 2011. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/218>>.
- 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.
- CARINA, F. G.; MARCELA, M. G.; CLAUDIA, B. F. Desenvolvimento placentário e interações materno fetais na espécie equina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 110, p. 593–594, 2015.
- CAZAROTTO, C. J. et al. Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 30–35, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.016>>.

CHUCRI, T. M. et al. **A review of immune transfer by the placenta** *Journal of Reproductive Immunology* Elsevier Ireland Ltd, , 2010. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.08.062>>.

COIRO, C. J.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C. Epidemiological Aspects in the *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* Infection in Horses from Botucatu, São Paulo, Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 32, p. 620–623, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.02.008>>.

COOK, A. G. et al. Interpretation of the detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in the serum of young horses. *Veterinary Parasitology*, v. 95, p. 187–195, 2001.

CORBELLINI, L. G. et al. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v. 30, n. 5, p. 863–868, 2000.

CUTLER, T. J. et al. Immunoconversion against *Sarcocystis neurona* in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. *Veterinary Parasitology*, v. 95, p. 197–210, 2001.

DANGOUDOUBIYAM, S. et al. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. *Journal of Parasitology*, v. 97, n. 3, p. 522–524, 2011. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2722.1>>.

DUARTE, P. C. et al. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, p. 8–13, 2003.

DUARTE, P. C. et al. 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. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 9, p. 1269–1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*, v. 209, n. 1–2, p. 1–42, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.026>>.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an Aborted Equine Fetus. *The Journal of Parasitology*, v. 76, n. 5, p. 732–234, 1990.

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.

ESTEBAN-REDONDO, I. et al. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Veterinary Parasitology*, v. 86, p. 155–171, 1999.

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.

FTHENAKIS, G. C. et al. Veterinary Parasitology Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 56–66, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.017>>.

FURR, M. et al. Clinical Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 618–621, 2002.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 129–132, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.023>>.

GONDIM, L. F. P.; LINDSAY, D. S.; MCALLISTER, M. M. Canine and bovine *Neospora caninum* control sera examined for cross-reactivity using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* indirect fluorescent antibody tests. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 86–88, 2009.

GRAY, L. C. et al. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. **Veterinary Record**, v. 149, p. 269–273, 2001.

GUERRA, N. R. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em equídeos do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 400–406, 2018.

GUIMARÃES, C. de F.; MEIRELLES, M. G.; FERNANDES, C. B. Eficiência placentária na espécie equina: Quais fatores podem estar relacionados? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 98–105, 2015.

HIDE, G. et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 136, p. 1877–1885, 2009.

HOFFMANN KORMANN, D. C. S. et al. 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.

IRVINE, K. L.; WALKER, J. M.; FRIEDRICH, K. R. Sarcocystid organisms found in bile from a dog with acute hepatitis: a case report and review of intestinal and hepatobiliary Sarcocystidae infections in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 57–65, 2016.

JEFFCOTT, L. B. The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 23, n. 23, p. 727–733, 1975.

JOHNSON, A. L.; BURTON, A. J.; SWEENEY, R. W. Utility of 2 immunological tests for antemortem diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* infection) in naturally occurring cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1184–1189, 2010.

KOCH, M. de O. et al. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in horses, dogs and cats from Paraná state, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 2, p. 1–8, 2019.

LASKOSKI, L. M. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti *Toxoplasma*

gondii antibodies in horses in the Pantanal of Mato Grosso , Brazil. **Semina**, v. 36, n. 2, p. 895–900, 2015.

LEBLANC, M. M. Immunologic considerations. In: KOTERBA. **Equine Clinical Neonatology**, p. 275–294, 1990.

LEON, A. et al. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Neospora caninum* in equine aborted fetuses and neonates. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, p. 179–183, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.11.001>>.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Paraná State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 215–221, 2006.

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

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Abortos em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul: Estudo de 72 casos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 22–26, 2012.

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (protozoa : Apicomplexa : Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 983–991, 1998.

MESQUITA, E. P. et al. Imunodeteccção de *Toxoplasma gondii* em tecido placentário de cabras naturalmente infectadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 1, p. 86–92, 2019.

MESQUITA, L. P. et al. Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum* 1. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 444–449, 2018.

MORAES, E. P. B. X. et al. Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 36–41, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.07.001>>.

MORENO, B. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 312–318, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.034>>.

OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Situação epidemiológica da infecção por *Toxoplasma gondii* em equídeos na microrregião do Brejo Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 995–1000, 2012.

OLIVEIRA, S. et al. Occurrences of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp., and *Sarcocystis neurona* in horses and dogs in the municipality of Pauliceia, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 277–282, 2017. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/123956>>.

PACKHAM, A. E. et al. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally

infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1239–1246, 2002.

PAPINI, R. A. et al. Seroprevalence and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Horses Slaughtered for Human Consumption in Italy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 8, p. 657–661, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.06.012>>.

PAZINATO, F. M. et al. Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 665–670, 2016.

PIERGILI FIORETTI, D. et al. *Neospora caninum* Infection and Congenital Transmission: Serological and Parasitological Study of Cows up to the Fourth Gestation. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, n. 8, p. 399–404, 2003.

PITEL, P.-H. et al. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 481–485, 2002.

PITEL, P. et al. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 1–6, 2003.

PIVOTO, F. L. et al. Anticorpo anti-*Neospora* spp. em amostras sorológicas de potro pré-colotais pela técnica de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1061–1064, 2012.

PIVOTO, F. L. et al. Serological status of mares in parturition and the levels of antibodies (IgG) against protozoan family *Sarcocystidae* from their pre colostrum foals. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 1–2, p. 107–111, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.001>>.

PUSTERLA, N. et al. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 281–285, 2011.

PUSTERLA, N. et al. Serological investigation of transplacental infection with *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* in broodmares. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 649–650, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.015>>.

QUEVEDO, P. S. et al. Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 29–32, 2015.

REJMANEK, D. et al. Congenital Transmission of *Toxoplasma gondii* in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) After Oral Oocyst Infection. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 516–520, 2010.

RIBEIRO, M. J. M. et al. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 142–150, 2016.

ROCCHIGIANI, G. et al. *Neospora caninum* in Wild Waterfowl: Occurrence of Parasite DNA and Low antibody titers. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 142–145, 2017.

- ROSSANO, M. G. et al. Cross-sectional study of serum antibodies against *Sarcocystis neurona* in cats tested for antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 4, p. 511–514, 2002.
- SANGIONI, L. A. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpersvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 321–323, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000200023&lng=pt&tlng=pt>.
- SHAAPAN, R. M. et al. PCR and serological assays for detection of *Toxoplasma gondii* infection in sport horse in Cairo, Egypt. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 158–165, 2012.
- SHAPIRO, K. et al. Dual congenital transmission of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* in a late-term aborted pup from a chronically infected southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **Parasitology**, v. 143, p. 276–288, 2015.
- SILVA, B. C. T. et al. Toxoplasmose Congênita: Estratégias De Controle Durante O Pré-Natal. **Cadernos da Medicina**, v. 2, n. 1, p. 16–26, 2019. Disponível em: <<http://www.revista.unifeso.edu.br/index.php/cadernosdemedicinaunifeso/article/view/1086/572>>.
- SPOHR, K. A. H. et al. Fatores de risco associados à prevalência de anticorpos anti-*Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equinos de Roraima, Amazônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1337–1343, 2018.
- STELMANN, U. J. P.; AMORIM, R. M. Mioencefalite Protozoária equina. **Veterinária e zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 163–176, 2010.
- Su, C.; Dubey, J.P. *Toxoplasma*. In: Dongyou L. **Molecular Detection of Foodborne pathogens**. London, UK. Taylor and Francis, p. 741-753, 2009.
- TOSCAN, G. et al. Neosporose equina: Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora* spp. e associação entre status sorológico de éguas e de suas crias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 641–645, 2010.
- TURNER, C. B.; SARVA, D. Evidence of *Toxoplasma gondii* in an equine placenta. **Veterinary Record**, v. 127, n. 4, p. 96, 1990.
- VALENÇA, S. R. de A. F. et al. Risk Factors for Occurrence of Anti-*Neospora* spp. Antibodies in Horses From Alagoas, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 11–12, p. 917–921, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jjevs.2015.08.014>>.
- VALENÇA, S. R. F. de A. et al. Low prevalence of infection by *Sarcocystis neurona* in horses from the State of Alagoas, Brazil. **Braslian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 298–302, 2019.
- VAN MAANEN, C. et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 351–364, 2004.

VARDELEON, D. et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 273–282, 2001.

VILLALOBOS, E. M. C. et al. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* spp. and fetal loss in equines. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 372–375, 2006.

VILLALOBOS, E. M. C. et al. Detection of *Neospora* sp. antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 68–70, 2012.

VILLENA, I. et al. New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 203–208, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.001>>.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v. 136, p. 1895–1900, 2009.

WÜNSCHMANN, A. et al. *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 2, p. 283–287, 2009.