

Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária
Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos

**INVESTIGAÇÃO DE *Hammondia heydorni* EM CAPRINOS ABATIDOS NO
MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA, BAHIA.**

MARIANA SAMPAIO ANARES DA SILVA

SALVADOR-BAHIA
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIANA SAMPAIO ANARES DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE *Hammondia heydorni* EM CAPRINOS ABATIDOS NO
MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA, BAHIA**

Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos, na área de Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Pita Gondim

**Salvador – Bahia
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Mariana Sampaio Anares da
Investigação de *Hammondia heydorni* em caprinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia/Mariana Sampaio Anares da Silva. – Salvador, 31/07/2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2008.

Professor Orientador – Prof. Dr. Luis Fernando Pita Gondim
Palavras-chave – *Hammondia heydorni*; *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, Diagnóstico molecular, Pequenos ruminantes.

1 - Silva, Mariana Sampaio Anares da Silva 2 - Coccidiose 3 – Diagnóstico molecular I- Investigação de *Hammondia heydorni* em caprinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia.

**INVESTIGAÇÃO DE *Hammondia heydorni* EM CAPRINOS ABATIDOS NO
MUNICÍPIO DE FEIRA DE SANTANA, BAHIA**

MARIANA SAMPAIO ANARES DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, 31 de julho de 2008.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luis Fernando Pita Gondim - UFBA
Orientador

Prof. Dra. Maria de Fátima Dias Costa - UFBA

Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Aos meus pais, João e Lêda, pelo apoio, carinho e torcida. Por serem a minha inspiração, o meu modelo, o exemplo que faço questão de seguir...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Fernando Pita Gondim, pelos ensinamentos, pelo imenso apoio e incentivo e pela atenção constante a mim dispensada;

À Prof. Dra. Maria Ângela Ornelas de Almeida, pela contribuição não somente à realização desse trabalho, mas, em especial por ter sido responsável pelo meu despertar para a pesquisa científica e o trabalho acadêmico;

À meus pais e meus irmãos, Camila e Dinho, por todo o carinho e incentivo e por estarem ao meu lado, sempre;

A Vítor, pelo amor, dedicação e paciência; por sempre acreditar em mim e fazer com que, ao seu lado, qualquer obstáculo pareça fácil de ser ultrapassado;

À minha amiga-irmã, Soraya; nenhuma palavra poderia fielmente representar o quanto a nossa amizade é importante para mim;

À minha grande família, por tornar todos os momentos da minha vida especiais e, em particular a Manuela, Sara e Maíra, mais do que primas, amigas de verdade;

Às amigas Cristiane, Cynthia, Zandra, Ana Cristina, Kika e Laísa, que, estando perto ou longe, fazem parte da minha história e são presença constante em minhas lembranças;

Aos meus queridos, antes colegas de laboratório, hoje amigos, Rosângela, Kattyanne, Sara, Larissa, Leane, Alan, Ilka e Juliana, pelo imensurável apoio e por transformarem cada dia de trabalho em um dia de alegria;

Aos colegas do Laboratório de Infectologia Veterinária, Bárbara, Danielle e Adriano, pela ajuda inestimável em diferentes etapas da execução desse projeto;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Soares, da USP, pela concessão do controle positivo de *H. heydorni* e contribuição durante a padronização da técnica de PCR *nested*;

À Profa. Dra. Kyoko Abe Sandes, do ICS-UFBA, pela colaboração para a realização do sequenciamento das amostras de DNA;

Ao Prof. Ricardo Portela, do ICS-UFBA, que gentilmente disponibilizou seus laboratórios para a realização de análises;

Ao Prof. Dr. Cláudio Roberto Madruga, por todo o apoio prestado sempre que solicitado;

À médica veterinária Dra. Flávia Freitas pelo auxílio na obtenção das amostras de caprinos;

À Prof. Dra. Alessandra Estrela e aos funcionários do Laboratório de Patologia;

Ao Prof. Adelmo Ferreira de Santana;

A todos os professores, funcionários e estudantes do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais, pelos bons momentos de trabalho compartilhados e, especialmente, aos estagiários Tatiane, Saulo, Débora e Mateus que colaboraram diretamente para a realização desse trabalho;

Ao Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia;

À FAPESB pela concessão da bolsa de mestrado e do auxílio dissertação;

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

“Inicie por fazer o necessário, então
o que é possível e, de repente, você
estará fazendo o impossível.”

(Francisco de Assis)

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO	XIII
SUMMARY.....	XIV
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DE <i>H. HEYDORNI</i>	4
<i>As primeiras descrições – Isospora bigemina, I. bahiensis e I. heydorni</i>	4
<i>Hammondia heydorni</i>	6
<i>A identificação de Neospora caninum</i>	7
2.2 DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOLÓGICA ENTRE <i>H. HEYDORNI</i> E OUTROS COCCÍDIOS FORMADORES DE CISTOS – <i>N. CANINUM, H. HAMMONDII</i> E <i>T. GONDII</i>	9
<i>Oocistos</i>	10
<i>Taquizoítos / Bradizoítos</i>	11
<i>Cistos teciduais</i>	13
<i>Cultivo Celular</i>	14
<i>Ciclo de vida e transmissão de H. heydorni</i>	15
2.3 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E MOLECULAR DE <i>H. HEYDORNI</i>	20
<i>Diversidade genética entre isolados de H. heydorni</i>	23
<i>Filogenia e classificação de H. heydorni</i>	25
2.4 SINAIS CLÍNICOS DA INFECÇÃO POR <i>H. HEYDORNI</i>	26
2.5 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>H. HEYDORNI</i>	27
<i>Dados epidemiológicos da infecção por H. heydorni e N.caninum em caprinos</i>	30
2.6 TESTES DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DE <i>H. HEYDORNI</i>	33
<i>Importância do diagnóstico diferencial de infecções por N. caninum e H. heydorni</i>	33
<i>Exame Parasitológico de fezes</i>	33
<i>Análise Histopatológica</i>	34
<i>Diagnóstico Imunológico</i>	35
<i>Diagnóstico Molecular</i>	37
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	55
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Análise genética de oocistos de <i>Hammondia heydorni</i> obtidos a partir de animais infectados natural ou experimentalmente.....	28
TABELA 2 – Frequência de <i>Hammondia heydorni</i> em fezes de cães, raposas e coiotes infectados naturalmente	29
TABELA 3 – Frequência de infecção por <i>Neospora caninum</i> em caprinos, detectada por meio de diferentes técnicas.....	32
TABELA 4 – Técnicas de PCR e primers desenvolvidos para o diagnóstico de <i>Hammondia heydorni</i> e sua diferenciação de coccídios próximos.....	38
TABELA 5 – Toxoplasmatinae parasites in goat tissues using a nested PCR assay followed by sequencing of the PCR fragments.	46
TABELA 6 – Results of a nested PCR and sequencing for detection of Toxoplasmatinae parasites and IFAT for detection of anti- <i>N. caninum</i> and anti- <i>T. gondii</i> antibodies	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Oocistos esporulados de <i>Hammondia heydorni</i>	10
FIGURA 2 – Ciclo de vida de <i>Hammondia heydorni</i> e <i>Neospora caninum</i>	16
FIGURA 3 – Diagrama ilustrando os componentes da unidade de repetição do rDNA, incluindo os genes 18S, 5.8S, 28S, um espaço não transcrito (NTS), um espaço externo transcrito (ETS) e dois espaços internos transcritos (ITS)	21
FIGURA 4 – Amplification with JS4-CT2b/CT1-CT2 primer pairs specific for Toxoplasmatinae.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

bp - Pares de base

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ETS - Espaçador Externo Transcrito

Hsp70 - Proteína do Choque Térmico de 70 kDa

IFAT - Indirect Immunofluorescent Antibody Test

IFI - Imunofluorescência Indireta

ITS1 - Espaçador não codificante interno 1

ITS2 - Espaçador não codificante interno 2

NTS - Espaçador não Transcrito

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

PCR-RFLP - Polymerase Chain Reaction coupled with Restriction Fragment Length Polymorphism

RAPD-PCR - Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction

rDNA - DNA Ribossômico

rRNA - RNA Ribossômico

TAE - Tris-Acetate-EDTA

VERO - Células Renais do Macaco Verde Africano

SILVA, M.S.A. **Investigação de *Hammondia heydorni* em caprinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia.** Salvador, Bahia, 2003. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2008.

RESUMO

Caprinos são hospedeiros intermediários de *Hammondia heydorni*, um protozoário coccídeo com cães e raposas como hospedeiros definitivos. A infecção por este protozoário parece ser assintomática para esta espécie animal, enquanto que a infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* pode resultar em aborto, natimortalidade e diminuição da produtividade em rebanhos. Como a caprinocultura é uma fonte de recursos econômicos para o estado da Bahia é importante conhecer e monitorar as doenças que ocorrem nesses animais e estabelecer métodos diagnósticos eficientes. O presente trabalho teve como objetivo investigar a frequência de *H. heydorni* em caprinos e comparar com as frequências de infecções por *N. caninum* e *T. gondii*. Amostras de tecido (cérebro, coração e língua) obtidas de 102 caprinos em um abatedouro no município de Feira de Santana – BA foram testadas por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) *nested* específica para o espaçador não-codificante interno 1 do DNA ribossômico da subfamília Toxoplasmatinae, com os primers JS4/CT2b e CT1/CT2. Foi registrada uma frequência total de 13,72% (14/102) de animais infectados com protozoários toxoplasmatíneos. Após o sequenciamento dos produtos da PCR *nested*, foram detectados 3,92% (4/102) de animais positivos para *H. heydorni*, 1,96% (2/102) para *N. caninum* e 7,84% (8/102) para *T. gondii*. Foram também pesquisados anticorpos IgG anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* nos animais, sendo que 9,8% e 21,6% dos animais foram positivos, respectivamente, pela reação de imunofluorescência indireta; não foi observada evidência de reação sorológica cruzada com as amostras de soro dos animais positivos para *H. heydorni* na PCR. Esta é a primeira vez que DNA de *H. heydorni* é identificado em amostras de tecidos de um hospedeiro intermediário infectado naturalmente.

Palavras-chave: *Hammondia heydorni*; *Neospora caninum*, Pequenos ruminantes, Reação de Polimerase em Cadeia *Nested*, *Toxoplasma gondii*.

SILVA, M.S.A. **Investigation of *Hammondia heydorni* in goats slaughtered in Feira de Santana city, Bahia.** Salvador, Bahia, 2008. 79p. Dissertation (Master of Science in Tropical Veterinary Medicine) - School of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, 2003.

SUMMARY

Goats are intermediate hosts of *Hammondia heydorni*, a coccidian parasite with dogs and foxes as definitive hosts. While infection by this parasite seems to be unassociated with any clinical signs, infection by *Neospora caninum* or *Toxoplasma gondii* can result in abortion, stillbirths and low yielding in caprine herds. Since breeding goats is a major source of economic resources in Bahia state, it is important to understand and monitor the diseases that occur in these animals, and to establish efficient diagnostic methods. The aim of this work was to investigate *H. heydorni* in goats and compare with the frequency of *N. caninum* and *T. gondii*. Tissue samples (brain, heart and tongue) were obtained from 102 goats in a slaughterhouse in the city of Feira de Santana, Bahia and tested by a nested polymerase chain reaction (PCR), specific to Toxoplasmatinae internal transcribed spacer 1 (ITS1) of the ribosomal DNA (rDNA), with primers JS4/CT2b and CT1/CT2. It was detected a total frequency of 13.72% (14/102) animals infected with Toxoplasmatinae organisms. After sequencing of nested PCR products from all positive tissues, of 3.92% (4/102) of the animals were positive for *H. heydorni*, 1.96% (2/102) for *N. caninum* and 7.84% (8/102) for *T. gondii*. Sera was assayed using indirect immunofluorescent tests and antibodies anti-*N. caninum* were found in 9.8% and anti-*T. gondii* in 21.6% of the animals, but there was no evidence of serological cross-reactions with *H. heydorni* PCR-positive animal's sera. This is the first report of DNA from *H. heydorni* in tissue samples from an intermediate host of the parasite.

Keywords - *Hammondia heydorni*, *Neospora caninum*, Nested-Polymerase Chain Reaction, Small Ruminants, *Toxoplasma gondii*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Hammondia heydorni (Dubey, 1977¹) é um parasito pertencente ao sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, e foi um dos primeiros protozoários coccídios relatados em cães. Descrito inicialmente como *Isoospora bigemina*, *I. bahiensis* e *I. heydorni* (Costa, 1956; Levine, 1973; Tadros & Laarman, 1976), foi incluído no gênero *Hammondia* após a descoberta de seu ciclo de vida heteroxeno obrigatório, semelhante à *Hammondia hammondi*, por Dubey & Fayer (1976). No ciclo de vida de *H. heydorni*, cães, raposas e coiotes são os hospedeiros definitivos, que excretam oocistos na forma não esporulada no ambiente após a ingestão de tecidos dos hospedeiros intermediários, na maioria ruminantes, contendo cistos teciduais (Dubey et al., 2002a).

Em 1988, foi descrito um novo protozoário coccídio, *Neospora caninum*, em cães com doença neurológica nos EUA (Dubey et al., 1988a). *N. caninum* é um parasito heteroxeno facultativo, que possui cães e coiotes como hospedeiros definitivos e bovinos, ovinos, bubalinos, eqüinos, cervídeos, caprinos, ratos, camundongos, gerbis e galinhas como hospedeiros intermediários (McAllister et al., 1998; Dubey et al., 2002a; Gondim et al., 2004b). *N. caninum* e *H. heydorni* apresentam diversas semelhanças com relação à morfologia da parede do cisto tecidual, a ultra-estrutura dos taquizoítos e as características do ciclo de vida, tornando difícil a sua diferenciação baseada apenas na morfologia e biologia (Dubey et al., 2002b; Heydorn & Mehlhorn, 2002). Além disso, os oocistos de *N. caninum* e *H. heydorni* são considerados morfologicamente indistinguíveis (Sreekumar et al., 2003).

Essas semelhanças levaram alguns autores a sugerir que *H. heydorni* e *N. caninum* poderiam representar uma única espécie e que *N. caninum* seria um nome inválido, sendo apenas uma cepa de *H. heydorni* (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Tenter et al., 2002). No entanto, foi demonstrado em estudos filogenéticos que, apesar de

¹ Dubey, J.P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: Kreier, J.P. **Parasitic Protozoa**. 1. ed. New York: Academic Press, 1977. p.101-237.

proximamente relacionadas, as espécies são geneticamente distintas (Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; Schares et al., 2002).

Embora *H. heydorni* tenha atraído pouca atenção desde a sua identificação por ser um parasito aparentemente não patogênico para seus hospedeiros (Blagburn et al., 1988; Matsui, 1991), com a descrição de *N. caninum*, tornou-se necessário o diagnóstico diferencial entre esses coccídios (Slapeta et al., 2002a), já que a neosporose, por sua vez, é reconhecida mundialmente como causadora de neuropatia em cães e abortamentos em bovinos, sendo responsável por perdas econômicas na indústria de produção bovina estimadas em milhões de dólares anuais (Dubey, 2003).

Em caprinos, a infecção por *N. caninum* ainda é considerada incomum, embora existam relatos de abortos e doença neurológica congênita (Dubey et al., 1996; Corbellini et al., 2001; Eleni et al., 2004). Mundialmente, a frequência de infecção por *N. caninum*, nesta espécie animal, avaliada por diferentes técnicas, variou entre zero e 15,0% (Ooi et al., 2000; Figliuolo et al., 2004; Naguleswaran et al., 2004; Faria et al., 2007; Masala et al., 2007; Moore et al., 2007; Uzêda et al., 2007). No estado da Bahia, onde foi registrada a maior frequência de anticorpos anti-*N. caninum* (Uzêda et al., 2007), estão concentrados aproximadamente 4.051.971 caprinos, o equivalente a 39% do efetivo nacional e o maior rebanho do Brasil (IBGE, 2008). A caprinocultura é uma importante fonte de renda para os produtores do estado e, para o seu crescimento como fonte de recursos à agropecuária baiana, é importante conhecer e monitorar as enfermidades que acometem essa espécie animal (Neto et al., 2008). Foi sugerido por alguns autores que a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em rebanhos caprinos pode estar relacionada com abortos e partos prematuros, resultando em diminuição da produtividade (Moore et al., 2007; Uzêda et al., 2007).

Não existem estudos sobre a frequência da infecção por *H. heydorni* em caprinos. Em parte, isso se deve a ausência de testes sorológicos ou imuno-histoquímicos para o diagnóstico de infecções causadas por esse protozoário, pois o parasito ainda não foi isolado em cultura celular (Speer et al., 1988; Schares et al., 2003; Dubey et al., 2004).

A aproximação filogenética e fenotípica entre *N. caninum* e *H. heydorni* (Mugridge et al., 1999) associada ao pouco conhecimento disponível sobre a antigenicidade de *H. heydorni*, são sugestivos de que reações sorológicas cruzadas podem ocorrer entre esses protozoários, levantando dúvidas sobre os estudos realizados com a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (Schaes et al., 2001). A reação de polimerase em cadeia (PCR) tem sido largamente utilizada, para a identificação de *H. heydorni* e *N. caninum* em tecidos de animais e sabe-se que os dois parasitos podem ser diferenciados geneticamente (Yamage et al., 1996; Ellis et al., 1999b; Schaes et al., 2005). Assim, o diagnóstico diferencial entre *H. heydorni* e *N. caninum* pode ser eficientemente realizado por meio de técnicas moleculares.

O presente estudo foi conduzido para determinar a frequência molecular de *H. heydorni* em caprinos abatidos no estado da Bahia, por meio de PCR e sequenciamento e analisar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*, nas amostras PCR-positivas para *H. heydorni*, pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e Classificação de *H. heydorni*

As primeiras descrições – *Isospora bigemina*, *I. bahiensis* e *I. heydorni*

Um coccídio encontrado em cães e gatos foi descrito inicialmente como *I. bigemina* Stiles, 1891, o qual apresentava dois tipos distintos, um tipo menor, com oocistos medindo 10-14 x 7,5-9 μm , desenvolvimento nas células epiteliais do intestino delgado e eliminação na forma não esporulada, e um tipo maior, com oocistos medindo 18-20 x 14-16 μm , desenvolvimento e maturação em tecidos subepiteliais (na lâmina própria) e eliminação na forma esporulada (Wenyon, 1926). Os oocistos apresentavam forma ovóide, contendo dois esporocistos e quatro esporozoítos cada (Brumpt, 1949).

O ciclo de vida de *I. bigemina* foi descrito como o mesmo para cães e gatos, com invasão inicial das células epiteliais pelo parasito e, em seguida, em infecções crônicas, das células subepiteliais com a presença de esquizontes e estágios sexuais em ambos os momentos. O parasito era considerado patogênico para o cão e o gato, que podiam apresentar sinais clínicos de diarreia, emaciação, anemia, fraqueza, hiporexia, febre e tremores musculares, mas também podia infectar a raposa, o furão e a marta (Levine, 1973).

No Brasil, uma variedade de *I. bigemina* foi descrita pela primeira vez e denominada *I. bigemina bahiensis*, após a detecção de oocistos em fezes de cães medindo 11,4-13,6 x 10,7-12,3 μm (Costa, 1956).

Foi relatada uma descrição do tipo menor de *I. bigemina* a partir de oocistos não esporulados encontrados em cão infectado naturalmente, medindo 10-14 x 10-12 μm e 12-14 x 10-12 quando esporulados (Levine & Ivens, 1965). Considerava-se ainda que a espécie pudesse infectar cães e gatos. Outros autores relataram a presença de oocistos de

I. bigemina em fezes de cães, com descrições morfológicas semelhantes (Fayer, 1974; Dubey & Fayer, 1976).

Foram descritos oocistos de tamanhos distintos de *I. bigemina* em cães e gatos, com variações ocorrendo inclusive entre isolados do mesmo hospedeiro. Esses oocistos, indistinguíveis de *T. gondii*, foram considerados pertencentes à mesma espécie, *I. bigemina*, embora experimentos de infecção experimental não houvessem sido conduzidos (Levine, 1973).

O conceito de dois tipos de *I. bigemina* com múltiplos hospedeiros permaneceu por muitos anos sem que experimentos fossem realizados para confirmá-los, até que a descoberta de *T. gondii* renovou o interesse por *I. bigemina* e outros coccídios de cães e gatos (Dubey & Fayer, 1976).

Entre 1973 e 1975, uma série de investigações foi conduzida para elucidar o ciclo de vida de *I. bigemina*, a partir de oocistos do tipo menor de *I. bigemina* obtidos em fezes de cão alimentado com carne bovina crua e denominados isolado *I. bigemina*-Berlim-1971 (Heydorn & Mehlhorn, 2002).

Esses oocistos produzidos em pequena quantidade foram infectantes para bovinos e a infecção foi transmitida novamente para cães, hospedeiros definitivos, pela ingestão de tecidos dos bovinos infectados. O ciclo de vida de *I. bigemina* foi considerado obrigatoriamente heteroxeno, pois cães infectados com oocistos não eliminavam oocistos. Oocistos não foram patogênicos para os hospedeiros e estágios teciduais extra-intestinais não foram identificados (Revisado por Dubey et al., 2002a e Heydorn & Mehlhorn, 2002).

As fases de desenvolvimento sexuada e assexuada do parasito ocorreram apenas nas células epiteliais do intestino delgado e não na lâmina própria, sugerindo que o parasito encontrado anteriormente na lâmina própria dos cães pertencia à outra espécie de coccídio e que o termo *I. bigemina* estava sendo utilizado para denominar mais de um parasito, inclusive diversas espécies de *Sarcocystis* sp (Dubey et al., 2002a). O parasito

que se desenvolvia na lâmina própria do cão passou a ser denominado *Sarcocystis bigemina* (Dubey et al., 2002b). Os oocistos de *Sarcocystis* sp se desenvolvem e esporulam na lâmina própria do intestino delgado de cães (Lindsay & Blackburn, 1991), hospedeiros definitivos de numerosas espécies desse coccídio, e não podem ser diferenciados somente pelas características morfológicas (Dubey et al., 2002a).

Assim, o parasito encontrado nas células epiteliais do intestino delgado passou a ser denominado tipo menor de *I. bigemina* do cão, pois não foi infectante para gatos, coelhos e camundongos imunocompetentes (Revisado por Dubey et al., 2002a e Heydorn & Mehlhorn, 2002). Foi possível completar, experimentalmente, todo o ciclo de *I. bigemina* no cão, embora seja pouco provável a ocorrência natural dessa via de transmissão. Pela infecção experimental de cães com o tipo menor de *I. bigemina*, foram registrados esquizontes e macro e micro gametas nas células epiteliais do intestino delgado. Os oocistos do tipo menor de *I. bigemina* foram considerados estruturalmente idênticos aos de *T. gondii* e *H. hammondi* (Dubey & Fayer, 1976).

Dubey (1976) denominou esse parasito *I. wallacei* numa tentativa de distinguir a espécie de *I. bigemina*. No mesmo ano, Tadros & Laarman (1976) denominaram o tipo menor de *I. bigemina* de *I. heydorni*, como uma homenagem ao pesquisador Heydorn por seu trabalho, e descreveram seus oocistos como medindo 10 x 9 µm. Como esse trabalho foi publicado um mês antes de Dubey (1976), a denominação *I. heydorni* prevaleceu.

Hammondia heydorni

O gênero *Hammondia* foi introduzido no ano de 1975, com a descrição de *H. hammondi*, um coccídio obrigatoriamente heteroxeno tendo o gato doméstico como hospedeiro definitivo e o camundongo como hospedeiro intermediário experimental (Frenkel & Dubey, 1975).

Como a heteroxenia obrigatória era uma característica também de *I. heydorni* (Dubey & Fayer, 1976), que apresentava oocistos estruturalmente semelhantes a *H. hammondi*, foi proposto que o coccídio fosse transferido para o gênero *Hammondia*, denominado *H. heydorni* (Tadros & Laarman, 1976) Dubey 1977, mesmo sem a identificação de um cisto tecidual. Esse nome foi aceito amplamente pela comunidade científica, embora *I. heydorni* e *I. bigemina* ainda tenham sido utilizados posteriormente (Heydorn & Mehlhorn, 2002).

Além de *H. heydorni* e *H. hammondi*, *H. pardalis* foi descrito como um coccídio pertencente ao gênero *Hammondia* e com o gato como hospedeiro definitivo (Dubey et al., 1988a). Posteriormente, descobriu-se que os estágios evolutivos de *H. pardalis* correspondiam a merontes de *Sarcocystis* sp e a oocistos de *Isospora* (Tadros & Laarman, 1982).

O tipo menor de *I. bigemina*, *I. bahiensis* e *I. heydorni* devem ser considerados a mesma espécie de coccídios, *H. heydorni* (Dubey et al., 2002a).

O gênero *Hammondia* pertence ao sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, com duas espécies, *H. heydorni* (Dubey², 1977 apud Heydorn & Mehlhorn, 2002) e *H. hammondi* (Frenkel & Dubey, 1975).

A identificação de *Neospora caninum*

Foi descrito em sistema nervoso central e tecido muscular de seis filhotes de uma cadela da raça Boxer, na Noruega, um protozoário formador de cistos morfologicamente semelhante e com cistos teciduais ultra estruturalmente distintos de *T. gondii* (Bjerkas et al., 1984).

² Dubey, J.P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: Kreier, J.P. **Parasitic Protozoa**. 1. ed. New York: Academic Press, 1977. p.101-237.

Um cão Greyhound, de três meses de idade, com sinais neurológicos e atrofia muscular dos membros posteriores, apresentou na avaliação histopatológica e ultra-estrutural, cistos contendo organismos semelhantes a *T. gondii*. Não foi possível identificar o parasito e a reação de imuno-histoquímica foi negativa para *T. gondii* (Hilali et al., 1986).

Encefalomielite associada à presença de cistos de protozoário foi observada no tecido cerebral de quatro bezerros, que não apresentaram anticorpos contra *Toxoplasma* ou *Sarcocystis*, entretanto a identificação do parasito não foi realizada (Parish et al., 1987). Parasitos semelhantes a *T. gondii* também foram encontrados associados a lesões histopatológicas presentes em um bezerro com encefalomielite que apresentou sinais neurológicos logo após o nascimento e veio a óbito com cinco dias de vida. Nesse caso, após avaliação da ultra-estrutura do parasito e pela realização da imuno-histoquímica, na qual as lesões reagiram fracamente com anticorpos anti-*Sarcocystis* e negativamente para anticorpos anti-*Toxoplasma*, sugeriu-se que poderia ser um novo gênero de coccídio (O'Toole & Jeffrey, 1987).

A partir da avaliação de parasitos intracelulares semelhantes a *T. gondii* e *Hammondia* sp em tecidos conservados de 10 cães com doença neuromuscular severa que haviam sido diagnosticados com toxoplasmose, um novo protozoário coccídio foi descrito e denominado *Neospora caninum*. O parasito, distinto estruturalmente e não reativo a anticorpos anti-*T.gondii* no teste imuno-histoquímico, possuía ciclo de vida desconhecido, reprodução assexuada por endodiogenia, vacúolo parasitóforo ausente e numerosas roptrias. Os taquizoítos mediram 4-7 μ m x 1,5-5 μ m e a parede dos cistos teciduais, encontrados em tecido nervoso, mediu 1-4 μ m de espessura (Dubey et al., 1988a).

N.caninum foi isolado em cultura celular a partir de tecidos de cães com doença neurológica idêntica a descrita por Bjerkas et al. (1984) apresentando cistos teciduais com parede espessa. Camundongos foram inoculados com tecidos desses cães e apresentaram cistos semelhantes em tecido cerebral e, a partir do isolamento, foi possível desenvolver um teste sorológico (Dubey et al., 1988b) e um método imuno-

histoquímico (Lindsay & Dubey, 1989) para o diagnóstico da infecção por *N. caninum* e sua diferenciação de *T. gondii*.

A classificação de *N. caninum* levantou dúvida sobre casos de toxoplasmose clínica diagnosticados anteriormente. Em casos de cães com doença neuromuscular associada com a presença de protozoários, a neosporose passou a ser considerada como diagnóstico diferencial (Dubey et al., 1988a; Uggla et al., 1989). Posteriormente, a identificação de oocistos de *N. caninum* resultou em um aumento do interesse por *H. heydorni*, pois se tornou necessário o diagnóstico diferencial de oocistos excretados por cães (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a; Mehlhorn & Heydorn, 2000).

No Brasil, o primeiro relato de infecção por *N. caninum* foi registrado em um feto bovino abortado de uma propriedade com histórico de abortamentos. Embora não tenha sido confirmada a causa do aborto, o animal apresentava título de anticorpos anti-*N. caninum* de 1:6.400 e alterações histopatológicas no cérebro características de neosporose bovina, como focos de necrose e gliose associada. O diagnóstico foi confirmado pela imuno-histoquímica (Gondim et al., 1999a).

O gênero *Neospora* pertence ao sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, com duas espécies, *N. caninum* (Dubey et al., 1988a) e *N. hughesi* (Marsh et al., 1998).

2.2 Diferenciação Morfológica e Biológica entre *H. heydorni* e outros Coccídios Formadores de Cistos – *N. caninum*, *H. hammondi* e *T. gondii*

A família Sarcocystidae compreende cerca de 200 espécies de coccídios que formam cistos teciduais em seus hospedeiros. Pelas características fenotípicas, a família é dividida em duas subfamílias, Sarcocystinae, uma subfamília monogenérica, que abrange a maioria das espécies, representada por *Sarcocystis* sp, e Toxoplasmatinae, uma subfamília com poucas espécies agrupadas em quatro gêneros: *Toxoplasma*, *Neospora*, *Hammondia* e *Besnoitia* (Mugridge et al., 1999).

O conhecimento das características morfológicas e estruturais e da localização desses organismos em cada estágio de desenvolvimento é importante para a classificação desses coccídios (Matsui et al., 1986).

Oocistos

A morfologia dos oocistos não é considerada uma característica fenotípica significativa para a diferenciação dessas espécies. *H. heydorni*, *N.caninum*, *H. hammondi* e *T. gondii* são protozoários com oocistos de tamanho similar (9-14 μm) (Lindsay et al., 1999b; Mugridge et al., 1999), com dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos após a esporulação (Frenkel & Smith, 2003), com parede fina, formato praticamente esférico e morfologicamente indistinguíveis entre si (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a) (Figura 1).

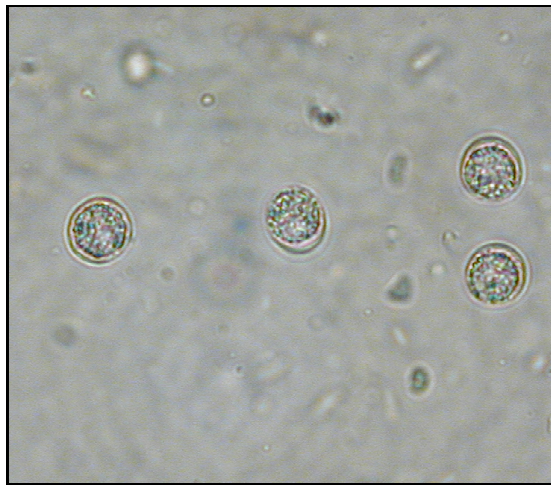


Figura 1. Oocistos não esporulados de *Hammondia heydorni*

Embora alguns autores tenham descrito diferenças entre os tamanhos de oocistos de *N.caninum* e *H. heydorni*, sugerindo que poderia ser possível a diferenciação das espécies e o desenvolvimento de critérios para a identificação de oocistos (Blagburn et al., 1988; Schares et al., 2005), a maioria dos trabalhos publicados com mensuração de

oocistos sustenta o contrário (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a; Lindsay et al., 1999b; Slapeta et al., 2002b).

Com a descoberta dos oocistos de *N. caninum* (McAllister et al., 1998) renovou-se o interesse pelo estudo morfológico desses parasitos, pois não é possível determinar com segurança se estudos realizados antes desse período sobre a morfologia de oocistos semelhantes a *H. heydorni* foram conduzidos com *N. caninum*, *H. heydorni* ou outro coccídio (Dubey et al., 2002a). Como não há mais amostras sorológicas do hospedeiro, DNA dos parasitos ou organismos disponíveis para comparação, trabalhos anteriores a 1998 devem ser reavaliados criticamente e citados com cautela para a discussão de diferenças biológicas entre esses coccídios (Schaes et al., 2001).

Taquizoítos / Bradizoítos

Os taquizoítos de *N. caninum* e *H. heydorni* apresentaram semelhanças ultra-estruturais entre si, como a presença de roptrias e corpos elétron densos localizados anteriormente e posteriormente ao núcleo, que os distinguiam de *H. hammondi* e *T. gondii*, nos quais as organelas estavam restritas a porção anterior do taquizoíto (Speer & Dubey, 1989a; Riahi et al., 1995). Exceto pela ausência de microporos, os bradizoítos de *N. caninum* e *T. gondii* são semelhantes em tamanho e em ultra-estrutura (Speer & Dubey, 1989b).

Taquizoítos de *N. caninum* foram considerados indistinguíveis aos de *T. gondii* e *H. heydorni* pela microscopia ótica, mas puderam ser diferenciados pela microscopia eletrônica. A ausência de microporos e a presença de numerosos micronemas e roptrias, algumas localizadas posteriormente, foram as principais características estruturais para a diferenciação de *T. gondii* (Dubey et al., 1988a; Speer & Dubey, 1989b; Speer & Dubey, 1989a).

Uma das principais diferenças observadas entre os taquizoítos de *N. caninum* e *H. heydorni* foi a não localização de *N. caninum* no vacúolo parasitóforo da célula do hospedeiro (Dubey et al., 1988a). Além disso, foi registrada a presença de diversos

grânulos de amilopectina e de um grande vacúolo próximo à terminação conoidal de *H. heydorni*, ausentes em *N. caninum* e um número maior de micronemas em *N. caninum* do que em *H. heydorni* (Dubey et al., 2002b).

Entretanto, diversos autores contestam as diferenças morfológicas e ultra-estruturais entre *N. caninum* e outros coccídios relacionados. Por exemplo, Heydorn & Mehlhorn (2002), em contradição ao que foi relatado por Dubey & Lindsay (1996), consideram que o número de roptrias e a disposição dos micronemas não podem ser utilizados para distinguir *N. caninum* de *T. gondii* porque podem variar grandemente. De acordo com Mehlhorn & Heydorn (2000), microporos foram observados em taquizoítos de *N. caninum* mantidos em cultivo celular (Speer & Dubey, 1989b) pelos mesmos autores que citaram a sua ausência em exemplares do parasito em tecidos de hospedeiros (Speer & Dubey, 1989a).

A ausência do vacúolo parasitóforo em *N. caninum* (Dubey et al., 1988a) também não é mais considerada um caractere válido para a diferenciação entre *N. caninum* e *H. heydorni*, já que esses autores, no mesmo ano, relataram à presença de um vacúolo parasitóforo em *N. caninum* (Dubey et al., 1988b). Outros autores também demonstraram que taquizoítos de *N. caninum* estão, de fato, localizados no interior de vacúolos parasitóforos (Speer & Dubey, 1989b; Lindsay et al., 1993).

Muitos erros foram descritos ao se estabelecer diferenças nos estágios móveis dos coccídios, os quais podem ter sido causados pela secção dos parasitos nas amostras de tecidos durante diferentes fases de atividade (Mehlhorn & Heydorn, 2000).

A dificuldade em se comparar e diferenciar efetivamente *N. caninum* de outros coccídios levou alguns autores a questionar a classificação do novo protozoário e afirmar que o nome *N. caninum* seria um *nomen nudum* (Heydorn & Mehlhorn, 2002).

Cistos teciduais

Um critério, também utilizado inicialmente para a diferenciação entre *N. caninum* e outros coccídios foi a morfologia dos cistos teciduais. A parede dos cistos de *N. caninum* mediu em média de 1-4 μ m e foi relativamente mais lisa, enquanto os cistos de *T. gondii* apresentaram a parede mais fina, menor que 0,5 μ m, com invaginações que se estendiam até a camada granular (Bjerkas et al., 1984; Dubey et al., 1988a; Dubey et al., 2002a). A camada granular da parede dos cistos dos dois coccídios foi semelhante com vesículas mergulhadas em uma matriz granular, embora em *N. caninum* as vesículas apresentassem uma matriz elétron densa, ausente em *T. gondii* (Speer & Dubey, 1989b).

Estágios extra-intestinais de *H. heydorni* ainda não foram demonstrados em tecidos de ruminantes ou de cães (Dubey et al., 2002a), mas cistos teciduais foram descritos em porco da Índia. Os cistos eram esféricos, com 10,6–13,0 μ m de diâmetro, com parede fina e continham 10 ou mais bradizoítos. A estrutura dos cistos foi similar a de *H. hammondi* e de *T. gondii*, embora os cistos de *H. heydorni* tenham sido encontrados no cérebro, em quantidade e tamanhos menores que os de *H. hammondi*, observados principalmente na musculatura estriada (Matsui, 1991). Não é possível determinar com segurança se os cistos encontrados no porco da Índia realmente eram cistos de *H. heydorni*, ou se poderiam ser cistos jovens de *N. caninum*. Em animais naturalmente infectados, o estágio de cisto tecidual de *H. heydorni* ainda não foi identificado conclusivamente (Dubey et al., 2002b). Talvez os estágios de *H. heydorni* nos hospedeiros intermediários sejam escassos ou não estejam amplamente distribuídos nos tecidos (Blagburn et al., 1988; Mohammed et al., 2003).

A principal localização dos cistos teciduais de *N. caninum* e *T. gondii* foi o tecido nervoso, enquanto cistos de *H. hammondi* ocorreram predominantemente nos músculos (Frenkel & Dubey, 1975; Dubey et al., 1988a; Speer & Dubey, 1989b). Também foram descritos cistos teciduais musculares para *N. caninum* (Bjerkas et al., 1984; Dubey & Lindsay, 1996) e os cistos de *H. heydorni* parecem não estar limitados ao tecido muscular (Mehlhorn & Heydorn, 2000). Embora não se saiba ao certo qual o tecido de predileção dos cistos teciduais de *H. heydorni*, cães alimentados com fígado, linfonodos

mesentéricos e baço de cães experimentalmente infectados e raposas alimentadas com esôfago, músculo esquelético, língua, diafragma ou coração do ruminante *Gazella gazella* naturalmente infectado excretaram oocistos do parasito (Matsui et al., 1986; Mohammed et al., 2003).

Alguns autores consideram que a espessura da parede do cisto não pode ser usada com segurança para diferenciar *N. caninum* de outros coccídios, uma vez que mensurações distintas foram descritas (Dubey et al., 1988a; Speer & Dubey, 1989b; Dubey & Lindsay, 1996) e a parede do cisto de *H. heydorni* e *H. hammondi* foi considerada idêntica a de *T. gondii*. É possível que as diferenças na espessura da parede do cisto tecidual de *N. caninum* ocorram de acordo com a duração da infecção, o tipo de tecido parasitado e o tamanho do cisto (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Dubey et al., 2002a). Tenter et al. (2002) afirmam que os parasitos dos gêneros *Hammondia*, *Toxoplasma* e *Neospora* não podem ser diferenciados pela ultra-estrutura ou pelo tamanho dos cistos teciduais.

Cultivo Celular

Alguns autores descreveram tentativas de isolamento de *H. heydorni* em cultivo celular. Na primeira delas, o parasito se multiplicou em diversas linhagens celulares, de bovinos e ovinos, mas parou de se desenvolver após alguns ciclos assexuados e não pôde ser transferido para outras linhagens celulares (Speer et al., 1988). Embora esse experimento tenha sido realizado antes da descoberta de *N. caninum*, a identidade do parasito foi confirmada, pois, de acordo com Dubey et al. (2002b), oocistos do mesmo grupo usado para indução do cultivo celular foram utilizados em estudos moleculares por Ellis et al. (1999b) e, pela PCR, apenas DNA de *H. heydorni* foi detectado no material.

Cistos biologicamente viáveis de *H. heydorni* foram obtidos a partir de um isolado de raposa em cultura celular de células diplóides embrionárias de coração bovino. O ciclo de vida foi completado com a infecção de uma raposa pela ingestão dos cistos teciduais

formados e posterior obtenção de oocistos. Entretanto, não se conseguiu estabelecer uma cultura celular contínua, pois houve decréscimo significativo no número de vacúolos parasitóforos após três meses de infecção. O isolado estudado foi considerado diferente do obtido a partir de cães, pois seus oocistos foram maiores e não foi possível a transmissão para cães pela ingestão de tecidos do hospedeiro intermediário ovino (Schaes et al., 2003).

Em outra tentativa de isolamento de *H. heydorni* os esporozoítos não infectaram a monocamada de células dérmicas de equinos e, embora tenham sido vistas formas em divisão, nenhum crescimento adicional foi observado e os parasitos gradualmente desapareceram das monocamadas após quatro semanas (Dubey et al., 2004). A falha em se manter a multiplicação *in vitro* de *H. heydorni* por períodos de tempo maiores pode indicar a ausência de requisitos necessários para o crescimento ou que a multiplicação está restrita a apenas alguns ciclos assexuados (Speer et al., 1988). Como não foi observada cistogênese *in vitro* de isolado de *H. heydorni* de cão, é possível que a formação de cistos *in vitro* seja uma característica para a distinção entre os isolados de cão e raposa (Schaes et al., 2003).

Ciclo de vida e transmissão de *H. heydorni*

Pouco se sabe sobre o ciclo de vida de *H. heydorni* e é possível que muitas informações não sejam confiáveis, pois foram obtidas antes da classificação de *N. caninum* (Dubey et al., 2002a). Hospedeiros intermediários infectam-se pela ingestão de oocistos esporulados, os quais são excretados na forma não esporulada nas fezes do hospedeiro definitivo canídeo (Dubey & Fayer, 1976). A transmissão do parasito para o hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de cistos teciduais, pois cães infectados experimentalmente com tecidos de hospedeiros intermediários eliminaram oocistos não esporulados e cães infectados naturalmente por *H. heydorni* apresentavam histórico de ingestão de carne crua (Pereira & Lopes, 1990; Matsui, 1991; Slapeta et al., 2002a) (Figura 2).

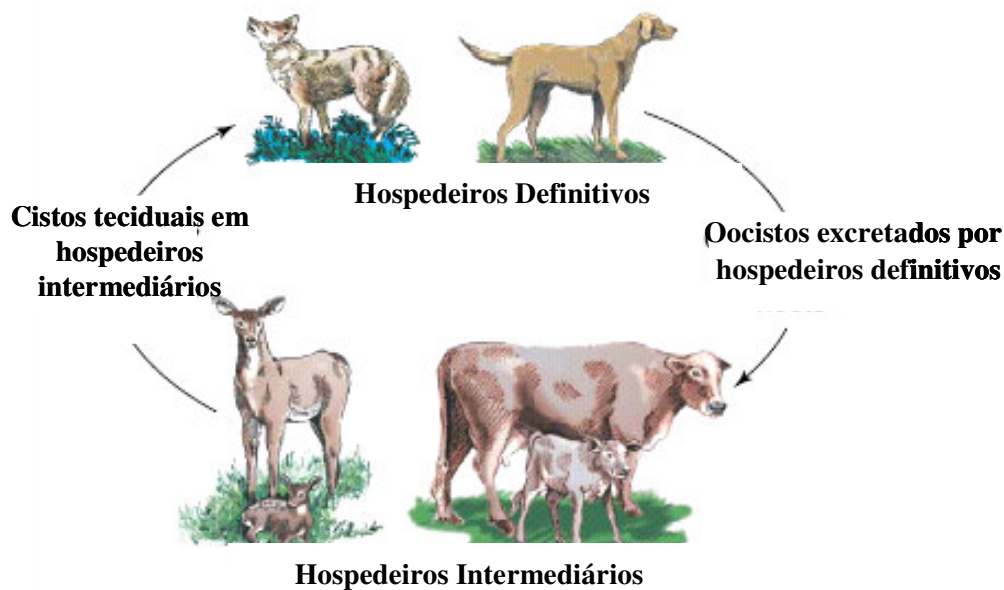


Figura 2. Ciclo de vida de *Hammondia heydorni* e *Neospora caninum* (Adaptado de Gondim, 2006)

Os protozoários coccídios formadores de cistos são heteroxenos, ou seja, possuem um ciclo de vida com dois ou mais hospedeiros e o hospedeiro definitivo elimina oocistos em suas fezes, os quais se desenvolvem até a formação de cistos teciduais quando são ingeridos por um hospedeiro intermediário (Frenkel & Smith, 2003). O gênero *Hammondia* compreende parasitos heteroxenos obrigatórios (Frenkel & Dubey, 1975), assim cães infectados com oocistos de *H. heydorni* esporulados não excretam oocistos (Dubey & Fayer, 1976; Blagburn et al., 1988).

Alguns autores acreditam que não foram conduzidos estudos suficientes para se determinar com segurança que *H. heydorni* é um parasito heteroxeno obrigatório. Uma taxa de infecção muito baixa e difícil de detectar ou uma procura por oocistos insuficiente, feita por curto período de tempo, poderiam resultar em falha na eliminação de oocistos após a ingestão de oocistos (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Dubey et al., 2002b).

Embora cães não excretem oocistos após a ingestão de oocistos de *H. heydorni*, eles podem atuar como hospedeiros intermediários, provavelmente com a formação de

estágios infectantes teciduais (Pereira & Lopes, 1990; Schares et al., 2003), pois cães alimentados com tecidos de cães infectados experimentalmente excretaram oocistos (Matsui et al., 1986).

Uma vez no trato digestivo dos cães, *H. heydorni* invade os tecidos extra-intestinais de hospedeiros definitivos e intermediários. O parasito foi detectado em células epiteliais do intestino delgado e fissões binárias e múltiplas foram observadas na divisão assexuada. Os esquizontes mediram aproximadamente 5–10 µm de diâmetro e cada um continha de três a 16 merozoítos, sem presença de corpo residual. Merontes foram registrados e os gametócitos foram observados a partir do 5º dia. Também foram observados microgametócitos, que continham de seis a 15 microgametas sem corpo residual. Os macrogametas mediram de 7-10µm e os zigotos apresentaram formato ovóide ou subesférico (Dubey & Fayer, 1976; Matsui et al., 1986). É possível que o estágio de cisto tecidual desenvolva-se a partir de 14 dias no hospedeiro intermediário, pois cães alimentados com tecidos de caprinos eutanasiados 14 dias após a infecção experimental excretaram oocistos (Blagburn et al., 1988).

A excreção de oocistos de *H. heydorni* nas fezes de hospedeiros definitivos ocorreu entre os dias cinco e 27 após infecção com cistos teciduais na raposa (Scharés et al., 2002; Mohammed et al., 2003) e entre os dias cinco e catorze após infecção no cão (Dissanaike & Kan, 1977; Dubey & Williams, 1980; Matsui et al., 1986; Pereira & Lopes, 1990; Hilali et al., 1995; Dubey et al., 2004). Os oocistos esporularam entre 48 e 72 horas após a excreção (Scharés et al., 2002).

O número de oocistos de *H. heydorni* excretados por cães foi considerado pequeno, embora não tenha sido quantificado (Dubey et al., 2004). Por outro lado, um cão infectado naturalmente por *H. heydorni* e sob tratamento com acetato de isoflupredona, excretou $1,37 \times 10^9$ oocistos em uma amostra de fezes. A administração de corticóides parece ser uma maneira de aumentar a excreção de oocistos de *H. heydorni* pelos cães (Blagburn et al., 1988).

A excreção de oocistos de *H. heydorni* por raposas também foi registrada. Após infecção experimental com tecidos de caprinos e ovinos, três raposas excretaram nas fezes ao longo de seis dias, um número total de $3,7 \times 10^7$ oocistos de *H. heydorni* e uma única raposa chegou a excretar 2×10^6 oocistos em um período de cinco dias (Schaes et al., 2002). Em outro trabalho, com infecção experimental por ingestão de tecidos de *G. gazella*, uma raposa excretou 4.350 oocistos num período de três dias (Mohammed et al., 2003).

Oocistos de *H. heydorni* – incluindo os trabalhos realizados com *I. bigemina* e *I. heydorni* - foram observados nas fezes de cães, raposas e coiotes, os hospedeiros definitivos, que ingeriram tecidos de hospedeiros intermediários infectados natural ou experimentalmente, como bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, gerbis, camelos, porcos da Índia e cervídeos (Fayer, 1974; Dissanaiké & Kan, 1977; Dubey & Williams, 1980; Blagburn et al., 1988; Matsui, 1991; Hilali et al., 1995; Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; Mohammed et al., 2003; Schaes et al., 2003; Dubey et al., 2004). Oocistos de *H. heydorni* não foram infectantes para gatos, camundongos, hamsters ou coelhos (Dubey & Fayer, 1976; Blagburn et al., 1988; Dubey et al., 2002a).

A identificação de *N. caninum* coloca em dúvida a maioria dos trabalhos realizados sobre hospedeiros intermediários e ciclo de vida de *H. heydorni* (Mohammed et al., 2003). As descrições sobre o ciclo de vida de *H. heydorni* anteriores a 1988 devem ser avaliadas com cuidado, pois não se pode determinar se a descrição corresponde ao ciclo de *H. heydorni*, de outro protozoário que possua o cão como hospedeiro definitivo ou de uma mistura de duas ou mais espécies de protozoários (Schaes et al., 2001).

Enquanto *N. caninum* é um parasito heteroxeno facultativo, *H. heydorni* é obrigatoriamente heteroxeno (Frenkel & Dubey, 1975; Frenkel & Smith, 2003;). Tanto a fase sexuada como a assexuada do desenvolvimento de *N. caninum* podem ser completadas no hospedeiro definitivo e ainda não foi esclarecido se cães podem excretar oocistos após a ingestão de oocistos (Dubey et al., 2002a).

Um dos fatores complicantes para uma diferenciação correta entre *N. caninum* e *H. heydorni* é a ausência de informações disponíveis sobre seus ciclos de vida. É difícil comparar estágios correspondentes do ciclo de vida desses parasitos em seus hospedeiros, pois as fases do ciclo que ocorrem no hospedeiro intermediário para *H. heydorni* e no hospedeiro definitivo para *N. caninum* são pouco conhecidas (Mugridge et al., 1999). Assim, ao contrário de *H. heydorni*, os estágios extra-intestinais de desenvolvimento de *N. caninum* são bem conhecidos (Dubey et al., 2002b) e esquizontes e gamontes de *H. heydorni* não podem ser comparados com *N. caninum*, porque ainda não foram demonstrados nessa espécie (Dubey et al., 2002a).

No ciclo de vida de *N. caninum*, o hospedeiro definitivo canídeo infecta-se pela ingestão de bradizoítos presentes em tecidos de herbívoros (Dubey et al., 2002a) e elimina oocistos na forma não esporulada no ambiente, que esporulam após um período mínimo de 24 horas (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a; Schares et al., 2001). A infecção no hospedeiro intermediário ocorre provavelmente pela ingestão de água ou comida contaminada por oocistos esporulados de *N. caninum* (Dubey et al., 2007). No intestino delgado do hospedeiro, os taquizoítos, o estágio de multiplicação rápida do parasito, provocam lesões celulares e ruptura de células intestinais. Com a ativação da resposta imune do hospedeiro os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, o estágio de multiplicação lenta, e se estabelece uma infecção persistente com a formação dos cistos teciduais (Buxton et al., 2002).

Todas as três formas infectantes de *N. caninum* (taquizoítos, bradizoítos e oocistos) estão envolvidas na transmissão do parasito. Além da transmissão horizontal pela ingestão de tecidos contendo cistos teciduais ou de oocistos esporulados, a infecção por *N. caninum* pode ser vertical, pela transmissão de taquizoítos de uma fêmea infectada para o seu feto durante a gestação (Dubey et al., 2007). Não há evidência disponível de que *H. heydorni* possa ser transmitido por via transplacentária (Dubey et al., 2002a).

Hospedeiros definitivos e intermediários de *N. caninum* foram identificados em infecção natural ou experimental. Os hospedeiros definitivos foram os cães (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a) e os coiotes (Gondim et al., 2004b), enquanto alguns hospedeiros intermediários foram bovinos, ovinos, búfalos, eqüinos, cervídeos, cães,

caprinos, ratos, camundongos, gerbis e galinhas (Thilsted & Dubey, 1989; Dubey & Lindsay, 1996; Dubey et al., 1996; Gondim et al., 2001; Schares et al., 2001; Rodrigues et al., 2004; Vianna et al., 2005; Hughes et al., 2006; Costa et al., 2008). Não existe evidência de que *N. caninum* infecte o homem e, embora tenham sido relatados níveis baixos de anticorpos, a presença do parasito ou de seu DNA não foram demonstrados em tecidos humanos (Dubey et al., 2007).

Assim, a classificação desses parasitos baseada somente em caracteres fenotípicos, como especificidade de hospedeiro, ciclo de vida, grau de heteroxenia, morfologia e localização do cisto tecidual e modo de transmissão de estágios infectantes, tem gerado controvérsia e discordância. Parece não haver um consenso a respeito da diferenciação de *H. heydorni* e *N. caninum*, que demonstram mais semelhanças entre si do que entre *N. caninum* e *T. gondii* ou entre as duas espécies de *Hammondia* (Mugridge et al., 1999).

Enquanto alguns autores afirmam que *N. caninum* é idêntico a *H. heydorni*, sendo provavelmente uma cepa patogênica desse último (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Heydorn & Mehlhorn, 2002; Tenter et al., 2002), o agrupamento de *H. heydorni* e *N. caninum* em uma única espécie é considerado inválido por autores que demonstraram diferenças genéticas entre eles (Homan et al., 1997; Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; McAllister, 2000). O uso de caracteres de natureza molecular pode esclarecer a importância que deve ser dada a cada uma das características fenotípicas e estabelecer uma classificação mais acurada dos coccídios formadores de cistos (Mugridge et al., 1999).

2.3 Caracterização Filogenética e Molecular de *H. heydorni*

Uma classificação ideal deve refletir as relações filogenéticas dos organismos, além de suas características fenotípicas. A análise filogenética molecular dos gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma* tem sido uma ferramenta valiosa para a classificação e reconstrução da filogenia dos protozoários, e guiado muitas pesquisas

sobre ciclos de vida, biologia e epidemiologia (Mugridge et al., 1999; Mugridge et al., 2000).

Diversos genes ou regiões do DNA têm sido utilizados em análises filogenéticas de protozoários coccídios, como o DNA ribossômico (rDNA), os genes codificadores da proteína de choque térmico de 70 kDa Hsp70 (*heat shock protein*) e o gene da alfa tubulina (Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; Slapeta et al., 2002b; Mohammed et al., 2003; Siverajah et al., 2003; Monteiro et al., 2007).

A maior parte dos estudos para inferência de relações filogenéticas da subfamília Toxoplasmatinae, utiliza a unidade de repetição do rDNA, que faz parte do genoma nuclear. Em células eucariontes, o rDNA é um grupo de genes organizados em unidades repetidas compostas por uma região promotora líder ETS (*external transcribed spacer*) e três regiões codificadoras dos RNAs ribossômicos (rRNA), que compreendem 18S, 5,8S e 28S intercaladas por dois espaçadores não-codificantes internos (ITS1 e ITS2). Cópias adjacentes das unidades repetidas do rDNA são separadas por um espaço não transcrito NTS (*nontranscribed spacer*) (Figura 3). Na maioria dos animais, existem centenas de cópias do rDNA no genoma nuclear que, se puderem ser eficientemente acessadas, representam um estoque infindável de marcadores para estudos genéticos e evolutivos (Mindell & Honeycutt, 1990).

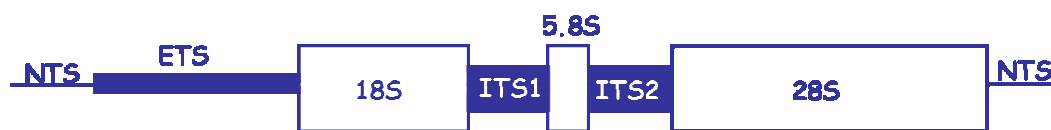


Figura 3. Diagrama ilustrando os componentes da unidade de repetição do rDNA, incluindo os genes 18S, 5.8S e 28S, um espaço não transcrito (NTS), um espaço externo transcrito (ETS), e dois espaços internos transcritos (ITS)

Diferentes partes do rDNA evoluem de maneira diferente. O gene 5,8S tem uso limitado para análises filogenéticas devido ao seu curto tamanho, com poucos sítios filogeneticamente informativos, enquanto o gene 18S, o rDNA da subunidade menor, é útil para estudo de eventos evolucionários antigos, pois é o gene que evolui mais

lentamente. Por outro lado, o gene 28S, o rDNA da subunidade maior, contém regiões que evoluem rapidamente e outras que evoluem lentamente e, assim, pode ser usado com sucesso para inferir relações filogenéticas entre organismos próximos (Hillis & Dixon, 1991).

Existe uma grande semelhança entre os nucleotídeos dos genes 18S, 5,8S e 28S dos rDNAs de *H. heydorni*, *N. caninum* e *T. gondii*, altamente conservados (Dubey et al., 2002a), e, enquanto o gene 18S foi considerado pouco divergente para esclarecer as relações filogenéticas entre eles, o gene 28S pôde fornecer inferências filogenéticas mais confiáveis (Mugridge et al., 1999).

A comparação de seqüências da região ITS1 do rDNA parece ser uma ferramenta importante para a caracterização de espécies e diferenciação entre parasitos coccídios proximamente relacionados, especialmente *H. heydorni* e *N. caninum* (Dubey et al., 2002a; Gondim et al., 2004a). Como outras seqüências do rDNA, o ITS1 está presente com um grande número de cópias, mas é mais variável e evolui mais rapidamente do que os genes das subunidades menor e maior, servindo como marcador para comparação entre táxons divergentes (Mindell & Honeycutt, 1990; Hillis & Dixon, 1991). Além disso, contém sítios polimórficos, o que reduz a chance de reações cruzadas e o torna uma das melhores escolhas para a diferenciação entre populações ou espécies dentro de um gênero (Holmdahl & Mattsson, 1996; Homan et al., 1997; Slapeta et al., 2002b).

A seqüência completa do ITS1 de *H. heydorni* foi determinada, com comprimento de 421 bp, sendo que nas cepas NC-1 de *N. caninum* e RH de *T. gondii* os seus comprimentos foram de 421 bp e 392 bp, respectivamente. As seqüências do ITS1 de *H. heydorni* e *T. gondii* diferiram em 22% dos nucleotídeos, enquanto *H. heydorni* e *N. caninum*, embora apresentem um ITS1 de tamanho semelhante, apresentaram 20% de diferenças entre si. Entre as seqüências de *N. caninum* e *T. gondii* foi observada uma similaridade de 82% e a maior diferença entre elas foi uma inserção de 23 bp na seqüência de *N. caninum* (Holmdahl & Mattsson, 1996; Payne & Ellis, 1996; Ellis et al., 1999b). O ITS1 é um marcador molecular espécie-específico valioso, pois os isolados

de *H. heydorni* e *N. caninum* possuem seqüências de ITS1 características e distintas o suficiente para permitir a sua diferenciação (Dubey et al., 2002a; Ellis & Pomroy, 2003).

Análises das seqüências gênicas de rDNA têm dado suporte aos principais agrupamentos de táxons apicomplexos realizados pelo uso de características morfológicas e de ciclo de vida (Mugridge et al., 2000; Tenter et al., 2002). Estudos conduzidos com seqüências parciais ou completas de genes do rDNA ou do ITS1 dos gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma* demonstraram que as espécies pertencentes a esses gêneros são proximamente relacionadas e que o gênero *Hammondia* é parafilético, sendo *H. heydorni* mais próximo de *N. caninum* e *H. hammondi* de *T. gondii*. Mesmo com a proximidade existente entre *H. heydorni* e *N. caninum*, essas espécies foram consideradas filogeneticamente distintas, confirmando que *N. caninum* é realmente uma nova espécie de coccídio (Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; Mugridge et al., 2000; Slapeta et al., 2002b; Mohammed et al., 2003; Sreekumar et al., 2003).

As comparações filogenéticas baseadas na análise de seqüências do gene da alfa tubulina e dos genes codificadores da proteína Hsp70 de *H. heydorni*, *N. caninum* e *T. gondii* também demonstraram seqüências de DNA similares, mas não idênticas, e as árvores filogenéticas foram consistentes com a separação de *N. caninum* e *H. heydorni* em duas espécies diferentes e com a parafilia do gênero *Hammondia* (Siverajah et al., 2003; Monteiro et al., 2007).

Diversidade genética entre isolados de *H. heydorni*

Pouca variabilidade genética e um nível semelhante de distância evolucionária entre *Hammondia* sp e protozoários coccídios relacionados (*N. caninum*, *N. huguesi* e *T. gondii*) foi observada em estudos moleculares com seqüências de nucleotídeos do gene codificador da proteína Hsp70, dos genes 18S e 28S do rDNA e do ITS1. Assim, dentre os grupos de parasitos Apicomplexos, esse é um dos menos divergentes (Ellis et al.,

1999b; Jenkins et al., 1999; Mugridge et al., 1999; Sreekumar et al., 2004; Monteiro et al., 2007).

Entretanto, estudos moleculares têm demonstrado a existência de diversidade genética entre isolados de *H. heydorni*. Análises de seqüências desse coccídio obtidos a partir de cão e de raposa demonstraram genótipos diferentes, sugerindo a existência de duas populações distintas de *H. heydorni*, uma que usa cães e outra que usa raposas como hospedeiros definitivos (Mohammed et al., 2003; Schares et al., 2005; Abel et al., 2006). Em infecção experimental de cães e raposas com tecido de hospedeiros intermediários caprinos e ovinos, apenas as raposas excretaram oocistos de *H. heydorni*, sugerindo a possibilidade de que esse isolado do coccídio possua apenas a raposa como hospedeiro definitivo (Schaes et al., 2002).

É possível que a diversidade genética entre cepas de *H. heydorni* seja independente do hospedeiro. O isolado obtido de cães que ingeriram tecido de veado (*White-tailed deer*, *Odocoileus virginianus*) infectado naturalmente apresentou maior proximidade genética com isolados de raposa do que de outros cães da Alemanha, República Checa e Austrália (Dubey et al., 2004). Duas cepas de *H. heydorni*, uma obtida de um cão naturalmente infectado dos EUA e outra de uma raposa capturada na Arábia Saudita, apresentaram seqüências de ITS1 idênticas, apesar de sua origem geográfica distante (Blagburn et al., 1988; Ellis et al., 1999b; Slapeta et al., 2002a). Assim, os polimorfismos observados entre isolados de *H. heydorni* originados de países e hospedeiros distintos parecem não ter relação com características biológicas ou geográficas (Sreekumar et al., 2004).

Em um estudo molecular com cinco cepas de *H. heydorni* isoladas de cão, três pares de primers, específicos para *H. heydorni* (Schaes et al., 2005), só foram capazes de detectar duas das cinco cepas do parasito, sugerindo que *H. heydorni* poderia agrupar mais de uma espécie de parasito ou que algumas das cepas testadas não seriam *H. heydorni* ou *N. caninum*, correspondendo à outra espécie de coccídio (Sreekumar et al., 2003). Porém, em outro relato, embora apenas seis, de 14 isolados de *H. heydorni*, tenham sido detectados com primers específicos para essa espécie, a identidade de todos

foi confirmada por sequenciamento do ITS1. Assim, parece haver um grau considerável de microheterogeneidade entre os isolados de *H. heydorni*, em contraste com a pouca heterogeneidade existente entre as seqüências correspondentes de ITS1 de isolados de *N. caninum* e *T. gondii* (Sreekumar et al., 2004), uma característica que pode corresponder a mais uma forma de distinção entre *H. heydorni* e *N. caninum* (Rodrigues et al., 2004).

Filogenia e classificação de *H. heydorni*

Baseado nos estudos filogenéticos e moleculares realizados até então, foi possível estabelecer algumas possibilidades acerca da nomenclatura dos coccídios dos gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma*. Foi sugerido que esses parasitos poderiam ser agrupados em um único gênero, pela pouca diversidade de nucleotídeos e sua proximidade filogenética e fenotípica (Mugridge et al., 1999; Monteiro et al., 2007). Entretanto, como o nome *N. caninum* tem sido usado desde 1988, se hoje ele fosse transferido para o gênero *Toxoplasma*, teria que ser feita a distinção entre a toxoplasmose causada por *N. caninum* ou por *T. gondii*. Assim, de forma prática, considerou-se melhor manter a distinção entre neosporose e toxoplasmose (Frenkel & Smith, 2003).

Esses coccídios também poderiam ser classificados em dois gêneros, de acordo com o hospedeiro definitivo, um gênero contendo *H. heydorni* e *N. caninum*, transmitidos por canídeos, e outro contendo *H. hammondi* e *T. gondii*, transmitidos por felídeos (Mugridge et al., 1999). Ou ainda, poderiam ser agrupados em três gêneros distintos: *Hammondia* (as duas variantes de *H. heydorni*), *Neospora* (*N. caninum* e *N. hughesi*) e *Toxoplasma* (*T. gondii* e *H. hammondi*) (Slapeta et al., 2002b; Monteiro et al., 2007).

Estabelecer as relações corretas entre organismos usando a reconstrução filogenética com base em dados moleculares depende de diversos fatores, como a escolha da seqüência de DNA a partir da qual a filogenia será inferida e o algoritmo filogenético usado (Mugridge et al., 2000; Tenter et al., 2002). As características filogenéticas

devem ser consideradas em estudos taxonômicos, mas seria pouco prático somente classificar um organismo novo depois que toda a análise genômica sobre ele fosse concluída (Frenkel & Smith, 2003). Embora a taxonomia possa considerar a filogenia, os caracteres fenotípicos são essenciais para o estudo sistemático e uma combinação de ambos deve possibilitar a construção de uma filogenia robusta para os protozoários coccídios, resultando em um trabalho taxonômico que reflita a história evolucionária dos parasitos e que seja amplamente aceito pela comunidade médica e científica (Tenter et al., 2002).

2.4 Sinais Clínicos da Infecção por *H. heydorni*

Outra diferença importante entre *H. heydorni* e *N. caninum* é a apresentação clínica da infecção por esses protozoários. *H. heydorni* parece não ser patogênico para os seus hospedeiros intermediários e definitivos e, embora existam alguns relatos de diarreia em cães associados com a excreção de oocistos de *H. heydorni*, é provável que esse sintoma tenha ocorrido como consequência de terapêutica imunossupressiva instituída para esses animais (Blagburn et al., 1988; Abel et al., 2006; Reichel et al., 2007).

Por outro lado, desde a descrição de *N. caninum* (Dubey et al., 1988a), a neosporose clínica emergiu como uma doença mundialmente reconhecida em bovinos e caninos, tendo sido relatada também em ovinos, caprinos, veados e cavalos. É considerada causa de abortamentos, perdas neonatais e doença neurológica congênita em bovinos e alterações neurológicas, como paralisia de membros posteriores em cães (Dubey, 2003).

Na espécie caprina os sinais clínicos observados na neosporose foram abortos, doença neurológica congênita e natimortalidade (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992; Dubey et al., 1996; Corbellini et al., 2001; Eleni et al., 2004). O papel de *N. caninum* como causa de abortamentos naturais em caprinos precisa ser investigado, já que a infecção experimental durante a gestação pode resultar em condição clínica similar a que ocorre em bovinos (Buxton et al., 2002). Além disso, as lesões microscópicas registradas na neosporose caprina também foram semelhantes àquelas associadas com a neosporose

bovina, como meningoencefalite não supurativa, presença de infiltrados perivasculares de células mononucleares (linfócitos, monócitos e neutrófilos) e áreas multifocais de necrose e gliose (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992; Lindsay et al., 1995; Eleni et al., 2004).

2.5 Epidemiologia da Infecção por *H. heydorni*

Para a discussão de dados epidemiológicos disponíveis sobre o coccídio *H. heydorni* deve-se levar em consideração a dificuldade de diferenciação morfológica e biológica entre *H. heydorni* e *N. caninum*. Algumas cepas consideradas anteriormente como *H. heydorni* podiam ser, na verdade, cepas de *N. caninum* ou até conter outras espécies de coccídios, como *T. gondii* e *Sarcocystis* sp. (Dubey et al., 2002a). O isolado *H. heydorni* Berlim 1996, por exemplo, após estudos moleculares, foi considerado indistinguível de *N. caninum* (Schaes et al., 2001).

Além das semelhanças filogenéticas e fenotípicas entre *H. heydorni* e *N. caninum*, outros fatores dificultam comparações epidemiológicas entre esses coccídios, como o baixo nível de infecção por *H. heydorni* nos hospedeiros intermediários. Infecções naturais por esse parasito foram em sua maioria confirmadas por bioensaios, justificando a escassez de informações acerca da infecção em animais (Blagburn et al., 1988; Matsui, 1991). Também não estão disponíveis testes diagnósticos sorológicos ou imuno-histoquímicos para as espécies de *Hammondia* (Mugridge et al., 1999).

Antes da identificação dos oocistos de *N. caninum* (McAllister et al., 1998) e mesmo depois, quando as técnicas moleculares para diferenciação entre *H. heydorni* e *N. caninum* ainda não estavam disponíveis, diversos relatos da presença de oocistos de *H. heydorni* foram publicados na Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul, sugerindo uma distribuição global do parasito (Costa, 1956; Dubey & Fayer, 1976; Dissanaiké & Kan, 1977; Gjerde, 1983; Hilali et al., 1995; Dubey et al., 2002a). Entretanto, não há como confirmar se esses oocistos realmente eram oocistos de *H.*

heydorni ou se poderiam ser de *N.caninum*, já que eles são morfologicamente indistinguíveis (Mugridge et al., 1999).

Recentemente, com a realização de estudos moleculares, foi possível confirmar a distribuição mundial de *H. heydorni* e alguns de seus hospedeiros intermediários e definitivos pela caracterização genética de diversos isolados obtidos a partir de cão ou de raposa (Tabela 1).

Tabela 1. Análise genética de oocistos de *Hammondia heydorni* obtidos a partir de animais infectados natural ou experimentalmente

Local	Hospedeiro Definitivo	Hospedeiro Intermediário	Nº de acesso GenBank	Região do Genoma Analisada	Referência
EUA	Cão	Caprino	AF076858 AF076870	ITS1 28S	Ellis et al., 1999b
Alemanha	Cão	Bovino	AF159240	28S	Mugridge et al., 1999
República Tcheca	Cão	ND	AF317280 AF317281 AF317282	ITS1	Slapeta et al., 2002a
Nova Zelândia	Cão	ND	AF508020 AF508029	ITS1 28S	Ellis & Pomroy, 2003
EUA	Cão	<i>Odocoileus virginianus</i>	AY530018	ITS1	Dubey et al., 2004
Alemanha	Cão	ND	ND	ITS1	Schares et al., 2005
Austrália	Cão	ND	DQ183058 DQ183059	ITS1 Gene da alfa-tubulina	Abel et al., 2006
Brasil	Cão	ND	Diversos	Hsp70	Monteiro et al., 2007
Alemanha	Raposa	Caprino Ovino	AF395866	28S	Schares et al., 2002
Arábia Saudita	Raposa	<i>Gazella gazella</i>	AF516885	28S	Mohammed et al., 2003

ND – Informação não disponível

A frequência de oocistos de *H. heydorni* em fezes de cães, raposas e coiotes foi determinada por identificação morfológica e métodos moleculares (Tabela 2). Entretanto, os estudos conduzidos sem a diferenciação molecular entre *H. heydorni* e *N. caninum* devem ser interpretados com cautela, pois os valores de frequência podem corresponder aos dois parasitos simultaneamente (Slapeta et al., 2002b).

Tabela 2. Frequência de *Hammondia heydorni* em fezes de cães, raposas e coiotes infectados naturalmente

Espécie	Local	Técnica	Frequência	Referência
Cão	São Paulo – Brasil	Exame coprológico	2,58% (7/271)	(Oliveira-Sequeira et al., 2002)
Cão	República Tcheca	Exame coprológico e PCR	0,16% (5/3135)	(Slapeta et al., 2002a)
Cão	Alemanha	Exame coprológico e PCR	0,05% (12/24089)	(Schaes et al., 2005)
Cão	Argentina	Exame coprológico	3,0% (/2193)	(Fontanarrosa et al., 2006)
Cão	Suíça	Exame coprológico	0,7% (24/3289)	(Sager et al., 2006)
Cão	República Tcheca	Exame coprológico	Área Urbana: 0,5% (19/3.780) Área Rural: 1,3% (7/540)	(Dubná et al., 2007)
Cão	Espanha	Exame coprológico	1,94% (35/1800)	(Martínez-Moreno et al., 2007)
Raposa	Canadá	Exame coprológico e PCR	0,0 % (0/271)	(Wapenaar et al., 2006)
Coioote	Canadá	Exame coprológico e PCR	0,0 % (0/185)	(Wapenaar et al., 2006)

A frequência de oocistos observada pode ser considerada baixa e dificulta a realização e a interpretação de análises estatísticas (Schaes et al., 2005). Não foram observadas relações significativas entre o tipo de alimentação dos cães, como a ingestão de carne crua, lixo ou roedores, e a excreção de oocistos de *Hammondia/Neospora* (Schaes et al., 2005; Sager et al., 2006). Por outro lado, a frequência de oocistos de

Hammondia/Neospora diminuiu com o aumento da idade e foi maior em cães de raça pura (Fontanarrosa et al., 2006) e de fazenda (Sager et al., 2006). Além disso, cães que vivem em abrigos, podem apresentar maior chance de infecção, devido à alta concentração de animais, as condições de higiene deficientes e a possibilidade de reinfecção permanente (Dubná et al., 2007).

Apenas um relato está disponível na literatura acerca da identificação e frequência molecular de *H. heydorni* em tecido animal. Na Austrália, 54 amostras de cérebro de roedores (*Mus domesticus*) foram testadas por uma técnica de PCR *nested* para a presença de DNA de *H. heydorni*, mas todas foram negativas. Considerando o tamanho da amostra e a sensibilidade da PCR usada no estudo, é possível que a infecção por *H. heydorni* seja rara em camundongos, embora mais informações sejam necessárias para confirmar essa hipótese, incluindo o estudo de outros tecidos (Barrat et al., 2008).

Dados epidemiológicos da infecção por *H. heydorni* e *N.caninum* em caprinos

Em caprinos, existem alguns relatos disponíveis na literatura da infecção experimental por *H. heydorni* (Dubey & Williams, 1980; Blagburn et al., 1988), inclusive no Brasil (Pereira & Lopes, 1990; Pacheco et al., 1991). Todavia, na maioria deles a identificação dos oocistos foi realizada com base em dados sobre sua morfologia disponíveis na literatura, não sendo possível determinar se realmente correspondiam a *H. heydorni* ou se tratavam de algum outro coccídio, como *N. caninum*, por exemplo.

Embora, até o momento, não existam descrições confirmadas molecularmente da infecção natural por *H. heydorni* em caprinos, existem registros de infecção experimental desses animais com oocistos do parasito (Blagburn et al., 1988; Schares et al., 2002). No estudo de Blagburn et al. (1988), não houve confirmação molecular da identidade dos oocistos, mas estes foram utilizados posteriormente em um estudo filogenético comparativo entre *H. heydorni*, *N. caninum*, *T. gondii* e *H. hammondi*, quando foi possível confirmar a identidade do parasito como *H. heydorni* (Ellis et al., 1999b).

Na espécie caprina, a infecção natural por *N. caninum* ainda é considerada incomum, pois poucos casos foram relatados em comparação com a espécie bovina (Eleni et al., 2004). As primeiras observações desse coccídio associadas com sinais clínicos em caprinos foram descritas na Califórnia (Barr et al., 1992) e na Pensilvânia (Dubey et al., 1992). Fetos abortados de caprinos pigmeus apresentaram cistos teciduais em cérebro e coração, com características morfológicas e imuno-histoquímicas compatíveis com *N. caninum*. Na Costa Rica foi relatado aborto associado com infecção por *N. caninum* em caprino de leite da raça Saanem. As lesões observadas foram muito semelhantes aos abortos registrados anteriormente como resultado de infecção por *N. caninum* e a presença de numerosos cistos teciduais com parede medindo de 0,5 a 1 µm de espessura foi registrada (Dubey et al., 1996).

Um caprino recém nascido da raça Saanem foi diagnosticado com neosporose congênita no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ao nascer, o animal apresentava ataxia, opistótono, dificuldade para se levantar, incapacidade de se alimentar sozinho e, após três dias, houve agravamento dos sinais clínicos e o animal foi eutanasiado. Os cistos teciduais com paredes medindo 1,1 – 3,0 µm de espessura apresentaram forte imunoreatividade com os anticorpos anti-*N. caninum* (Corbellini et al., 2001).

Na Itália *N. caninum* foi detectado em um feto caprino abortado; cistos do parasito, cuja identidade foi confirmada por PCR, foram observados no cérebro do animal (Eleni et al., 2004).

Infecção experimental por *N. caninum* em caprinos foi descrita por alguns autores. Fêmeas foram infectadas experimentalmente com taquizoítos de *N. caninum* durante a gestação, servindo como modelo experimental para o estudo dos abortamentos causados por esse parasito em ruminantes (Lindsay et al., 1995). Em um outro estudo, caprinos foram infectados por meio de inoculação oral com oocistos de *N. caninum* (Schares et al., 2001). A infecção experimental de fêmeas gestantes sugere que *N. caninum* pode ser uma causa de perdas reprodutivas silenciosas em ruminantes (Lindsay et al., 1995).

Em um rebanho caprino, cuja frequência de anticorpos anti-*N. caninum* foi de 15%, relatos de abortos e nascimentos prematuros foram freqüentes, sugerindo uma associação entre a infecção por *N. caninum* e perdas reprodutivas, como em bovinos (Uzêda et al., 2007). Embora essa afirmação precise ser investigada, em rebanhos caprinos com baixas taxas reprodutivas é importante considerar a neosporose como um dos diagnósticos diferenciais, especialmente se houver evidência sorológica de infecção por *N. caninum* (Moore et al., 2007).

Trabalhos demonstrando evidência sorológica de *N. caninum* em caprinos têm sido realizados em todo o mundo (Tabela 3). No Brasil, a frequência desse parasito em caprinos, assim como o significado da doença nessa espécie, tem sido pouco investigada (Faria et al., 2007).

Tabela 3. Frequência de infecção por *Neospora caninum* em caprinos, detectada por meio de diferentes técnicas

Local	Técnica	Frequência	Referência
Sri Lanka	ELISA	0,6% (3/486)	(Naguleswaran et al., 2004)
Costa Rica	IFI	7,4% (6/81)	(Dubey et al., 1996)
Taiwan	IFI	0,0% (0/24)	(Ooi et al., 2000)
São Paulo – Brasil	IFI	6,4% (25/394)	(Figliuolo et al., 2004)
Paraíba – Brasil	IFI	3,0% (10/306)	(Faria et al., 2007)
Argentina	IFI	6,6% (106/1594)	(Moore et al., 2007)
Bahia – Brasil	IFI	15,0% (58/384)	(Uzêda et al., 2007)
Itália	PCR Feto	8,6% (2/23)	(Masala et al., 2007)
Itália	PCR Placenta	0,0% (0/8)	(Masala et al., 2007)

A ingestão de tecido muscular não cozido de caprinos infectados com *N. caninum* pode ser suficiente para a eliminação de oocistos pelo hospedeiro definitivo canídeo, resultando em infecção por *N. caninum* nos rebanhos bovinos. Assim, mesmo que a neosporose não seja um grande problema em rebanhos caprinos, esses animais podem atuar como mantenedores do parasito, especialmente em propriedades que possuam rebanhos consorciados (Schaes et al., 2001).

2.6 Testes Diagnósticos para a Detecção de *H. heydorni*

Importância do diagnóstico diferencial de infecções por *N. caninum* e *H. heydorni*

Embora *H. heydorni* tenha atraído pouca atenção desde o seu descobrimento por ser um parasito aparentemente não patogênico para seus hospedeiros (Blagburn et al., 1988; Matsui, 1991), com a descrição de *N. caninum*, tornou-se necessário o diagnóstico diferencial de infecções causadas por esses coccídios (Slapeta et al., 2002a), já que a neosporose é responsável por perdas econômicas na indústria de produção bovina estimadas em milhões de dólares anuais (Dubey, 2003).

A proximidade morfológica, biológica e genética existente entre *H. heydorni* e *N. caninum* sugere uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos que permitam a detecção e diferenciação da infecção por esses coccídios formadores de cistos em hospedeiros intermediários e definitivos (Mugridge et al., 1999). A obtenção de informações epidemiológicas acuradas sobre a infecção por *N. caninum* é necessária e, portanto, *H. heydorni* deve sempre ser considerado como diagnóstico diferencial de *N. caninum* (Slapeta et al., 2002b).

Exame Parasitológico de fezes

Devido à semelhança entre oocistos dos parasitos dos gêneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma*, o exame microscópico das fezes não é suficiente para a identificação das espécies desses coccídios (Monteiro et al., 2008) e o diagnóstico coprológico desses parasitos no hospedeiro definitivo é considerado difícil ou até mesmo impossível de ser realizado (Slapeta et al., 2002b). A frequência de *H. heydorni* em fezes de cães, quando avaliada apenas pela morfologia de oocistos não é conclusiva e os oocistos identificados dessa forma são classificados como semelhantes a *Hammondia* ou a *Neospora* (*Hammondia-like* ou *Neospora-like*) (Fontanarrosa et al., 2006; Dubná et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2007).

Os métodos freqüentemente utilizados para detecção de oocistos de coccídios em amostras de fezes consistem na execução de técnicas de flutuação padrão com solução de NaCl, de açúcar ou de ZnCl₂, seguida por observação sob microscopia óptica com uma magnificação mínima de 200 vezes. Para esporulação e posterior análise morfológica, os oocistos podem ser mantidos em solução de dicromato de potássio a 2% (Schaes et al., 2002; Mohammed et al., 2003; Schares et al., 2005). A comparação morfométrica dos oocistos, realizada por meio ótico ou digital, pode resultar em erros variáveis no caso de medição de objetos pequenos, como os oocistos (Dubey et al., 2002a).

Técnicas de bioensaio com gerbis ou camundongos imunossuprimidos podem auxiliar na diferenciação entre oocistos de coccídios presentes nas fezes de cães. Oocistos de *H. heydorni* e de *N. caninum* foram infectantes para gerbis (Schaes et al., 2003; Schares et al., 2005). A inoculação desses roedores com oocistos, seguida por investigação sorológica, molecular e histopatológica, além da posterior inoculação de tecidos dos hospedeiros intermediários infectados em cultivo celular, pode permitir a identificação da espécie do parasito e possibilitar o seu isolamento (Gondim et al., 2001; Schares et al., 2001; Dubey et al., 2004).

Em amostras de fezes, após o achado de oocistos semelhantes a *Hammondial/Neospora*, se houver interesse na identificação da espécie do parasito, pode ser utilizado um método diagnóstico molecular adicional (Slapeta et al., 2002a; Monteiro et al., 2008), enquanto que para a realização de estudos epidemiológicos por meio de exames parasitológicos de fezes é necessária a utilização de técnicas moleculares para confirmação da identidade dos oocistos encontrados (Schaes et al., 2005; Abel et al., 2006).

Análise Histopatológica

A análise histopatológica é um importante procedimento para o diagnóstico da neosporose clínica, pois a presença de anticorpos anti-*N. caninum* no soro de um animal pode ser apenas um indicativo de exposição prévia ao parasito. Embora seja possível a

ocorrência de aborto pela infecção por *N. caninum* sem a presença de lesões fatais (Dubey & Schares, 2006), o achado histopatológico de lesões típicas, como encefalite não supurativa focal e necrose, é necessário para o diagnóstico definitivo da neosporose (Dubey, 2003).

Existe uma descrição de cistos teciduais em porcos da Índia experimentalmente infectados com oocistos de *H. heydorni* (Matsui, 1991), entretanto, tecido ou soro desses animais não estão disponíveis para análise e não foi possível a confirmação da identidade do parasito observado (Dubey et al., 2002a). Até o momento, estágios teciduais de desenvolvimento de *H. heydorni* não foram demonstrados em cortes histológicos (Blagburn et al., 1988, Schares et al., 2002).

Diagnóstico Imunológico

A determinação da frequência e do título de anticorpos específicos contra um agente infeccioso em um indivíduo ou em uma população de animais se constitui em uma ferramenta valiosa para a realização de diagnóstico e pesquisas epidemiológicas. Os testes sorológicos podem ser utilizados *ante mortem* ou *post mortem* e permitem a diferenciação entre infecções agudas e crônicas (Osawa et al., 1998; Dubey & Schares, 2006). Além disso, é possível que, em alguns casos, uma infecção somente possa ser diagnosticada pela sorologia, como relatado por Schares et al. (2001) que, ao promoverem a infecção experimental de animais com oocistos de *N. caninum*, não conseguiram evidenciar a infecção pela PCR ou histopatologia, e a sorologia foi a única técnica que confirmou a transmissão para os animais.

A primeira técnica para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* foi a imunofluorescência indireta (IFI) (Dubey et al., 1988b), empregada em diversos estudos epidemiológicos (Barr et al., 1995; Paré et al., 1995; Figliuolo et al., 2004; Rodrigues et al., 2004) e considerada padrão ouro para o diagnóstico sorológico desse protozoário (Björkman & Uggla, 1999).

Outros testes sorológicos foram empregados para o diagnóstico da infecção por *N. caninum*, como o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), os testes de aglutinação direta, o imunoblotting e o teste imunocromatográfico rápido (RIT) (Revisado por Dubey & Schares, 2006).

Embora não seja uma técnica sorológica, a imuno-histoquímica utiliza-se de anticorpos específicos anti-*N. caninum* com o objetivo de detectar esse parasito em secções de tecido fixado em formalina e embebido em parafina por um método de coloração com imunoperoxidase. Desde o seu desenvolvimento por Lindsay & Dubey (1989), essa técnica tem sido usada para a confirmação diagnóstica de infecção por *N. caninum* (Gondim et al., 1999a; Corbellini et al., 2001).

O desenvolvimento de testes imunológicos para a detecção da infecção por *N. caninum* em diferentes espécies de hospedeiros é dependente do isolamento do parasito em cultivo celular (Dubey et al., 1988b; Schares et al., 2001), o que permite a produção de antígeno para padronização das técnicas. *N. caninum* tem sido cultivado *in vitro* em diversas linhagens celulares e mantido continuamente pela inoculação de novas culturas (Dubey & Schares, 2006). Entretanto, até o momento, parece não ser possível o estabelecimento e manutenção de *H. heydorni* em cultivo celular e, assim, não existem testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico desse coccídio (Speer et al., 1988; Schares et al., 2003).

Dessa forma, enquanto *T. gondii* e *N. caninum* podem ser diferenciados sorologicamente (Frenkel & Smith, 2003), o conhecimento disponível sobre a antigenicidade de *H. heydorni* é esparso. Os estudos iniciais em hospedeiros intermediários infectados com *H. heydorni* não demonstraram reação sorológica cruzada com *T. gondii* no teste Sabin-Feldman (Schaes et al., 2001), assim como Nishikawa et al. (2002) relataram ausência de reação entre soro de cão anti-*H. heydorni* e antígenos de superfície de *N. caninum*. Por outro lado, um cão que ingeriu tecidos de cervídeos com títulos de anticorpos anti-*N. caninum* de 1:25 e 1:50 excretou oocistos de *H. heydorni* (Dubey et al., 2004).

Existe a possibilidade de que estudos sobre a neosporose, realizados por meio de técnicas sorológicas, apresentem erros, pois pouco se sabe sobre a antigenicidade de *H. heydorni* e a possibilidade de reações cruzadas com *N. caninum* e outros parasitos apicomplexos (Schaes et al., 2001).

Diagnóstico Molecular

Existe um interesse crescente no uso de técnicas de diagnóstico molecular, como a PCR, para o estudo de *H. heydorni* e protozoários coccídios relacionados. As técnicas moleculares permitiram a caracterização de diversos genes de *H. heydorni*. A reação de PCR, muitas vezes seguida pelo sequenciamento do DNA genômico, é conclusiva para a identificação do parasito na amostra analisada (Barrat et al., 2008), além de possibilitar a realização de estudos taxonômicos e epidemiológicos, a investigação de diversidade genética entre cepas e o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos e sensíveis (Tabela 4).

As diferentes técnicas de diagnóstico molecular, além de possibilitarem a identificação e/ou o diagnóstico diferencial entre coccídios da subfamília Toxoplasmatinae (Mohammed et al., 2003; Schaes et al., 2005; Wapenaar et al., 2006), permitiram também a análise de oocistos de *I. bigemina* de isolados de fezes de cães, para a confirmação de sua identidade (Dubey et al., 2002a). O isolado Berlim-1974 foi utilizado posteriormente para a caracterização molecular de *H. heydorni* (Mugridge et al., 1999; Heydorn & Mehlhorn, 2002), enquanto que o isolado Berlim-1996 foi considerado indistinguível de *N. caninum* (Schaes et al., 2001).

As técnicas de PCR são consideradas sensíveis para a detecção de parasitos em amostras de tecidos ou de fezes; foi possível detectar DNA equivalente a um taquizoítio de *N. caninum* em 1mg de tecido cerebral (Yamaga et al., 1996) e de 10 oocistos de *H. heydorni* em 0,5µl de água destilada (Slapeta et al., 2002a). Entretanto, nem sempre uma reação padronizada com controles positivos e negativos funcionará satisfatoriamente ao ser testada com amostras clínicas (Holmdahl e Mattsson, 1996).

Alguns fatores podem interferir no resultado do ensaio; a alta sensibilidade das técnicas, por exemplo, pode resultar em amplificação de contaminantes e resultados falso-positivos. Assim, para a obtenção de um resultado seguro, a técnica deve ser executada de forma asséptica, com a limpeza cuidadosa de materiais e equipamentos e inclusão de mais de um controle negativo (Ellis et al., 1999a).

Tabela 4. Técnicas de PCR e primers desenvolvidos para o diagnóstico de *Hammondia heydorni* e sua diferenciação de coccídios próximos

Técnica	Primers	DNA alvo	Referência
PCR convencional	CR1 CR2	28S de Coccídios	Ellis et al., 1999b
PCR convencional	JS4 JS5	ITS1 de <i>H. heydorni</i>	Slapeta et al., 2002a
PCR convencional	CT1 CT2	ITS1 de Toxoplasmatinae	Sreekumar et al., 2003
RAPD-PCR	HhAP7F HhAP7R	<i>H. heydorni</i>	Sreekumar et al., 2003
RAPD-PCR	HhAP10F HhAP10R	<i>H. heydorni</i>	Sreekumar et al., 2003
PCR convencional	AT9 AT264	Gene da alfa tubulina (<i>H. heydorni</i>)	Abel et al., 2006
PCR convencional	JS4 CT2b	ITS1 de Toxoplasmatinae	Monteiro et al., 2007
PCR convencional	HSPF HSPR	Hsp70 (Gêneros <i>Hammondia</i> , <i>Neospora</i> e <i>Toxoplasma</i>)	Monteiro et al., 2007
PCR-RFLP	Hsp400F Hsp400R	Hsp70 (<i>H. heydorni</i> e <i>N. caninum</i>)	Monteiro et al., 2008
PCR <i>nested</i>	JB1 JB2 HYD HYD SF1 SF2	18S, ITS1 de Toxoplasmatinae (1ª. amplificação) ITS1 de <i>H. heydorni</i> (2ª. amplificação) ITS1 de <i>N. caninum</i> (2ª. amplificação)	Barrat et al., 2008

Por outro lado, um resultado falso negativo pode ser consequência da presença de grande quantidade de DNA do hospedeiro em relação à quantidade de DNA do parasito a ser pesquisado (Yamaga et al., 1996). Além disso, *H. heydorni* e *N. caninum* podem não estar distribuídos uniformemente nos tecidos dos hospedeiros, pois reações de PCR realizadas com amostras diferentes do mesmo tecido apresentaram resultados distintos (Blagburn et al., 1988; De Marez et al., 1999). A dificuldade em reproduzir um resultado em uma amostra de tecido pode ser minimizada com a realização de reações de PCR em triplicata (Hughes et al., 2006), pois existe a possibilidade de que o parasito esteja ausente do fragmento testado e, assim, não seja detectado (Ellis et al., 1999a).

O uso de um único tipo de tecido para a PCR, como o cérebro, por exemplo, também pode fazer com que se subestime a verdadeira frequência do parasito em animais. Ao avaliar a frequência de *N. caninum* em tecidos de roedores, Barrat et al. (2008) observaram que alguns animais não foram positivos no cérebro, mas somente em coração ou fígado e afirmaram que, conseqüentemente, a análise de diferentes tipos de tecido pode aumentar a frequência de resultados positivos na PCR.

Uma forma de aumentar a sensibilidade na detecção de DNA do parasito é o uso da PCR *nested*, na qual uma amplificação inicial com primers externos é seguida por uma segunda amplificação do produto obtido com primers internos. A presença de duas amplificações sucessivas aumenta a sensibilidade da reação e tem sido usada com sucesso para o diagnóstico da infecção por protozoários coccídios, enquanto o uso da PCR convencional pode levar a subestimação da frequência desses parasitos (Ellis et al., 1999a; Medina et al., 2006; Barrat et al., 2008). É possível que o uso de primers específicos em uma reação de PCR convencional não seja sensível o suficiente para a detecção de *H. heydorni* em tecidos animais (Wapenaar et al., 2006).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Investigation of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil.

SILVA¹, Mariana Sampaio Anares da; UZÊDA¹, Rosângela Soares; COSTA¹, Kattyane Souza; SANTOS¹, Sara Lima; MACEDO¹, Alan Caine Costa de; SANDES², K.A.; GONDIM^{1*}, Luis Fernando Pita.

¹Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Avenida Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brazil 40170-110

²Universidade Estadual da Bahia - UNEB

* Corresponding author (GONDIM, Luis Fernando Pita) - E-mail: pita@ufba.br

Summary

Hammondia heydorni is a coccidian parasite with an obligatory two host life cycle, with dogs and foxes as definitive hosts, and a number of intermediate hosts, including goats. While infection by this parasite seems to be unassociated with any clinical signs, infection by the closely related parasites *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* can result in abortion, stillbirths and low yielding in caprine herds. The aim of this work was to investigate *H. heydorni* in goat tissues using a nested polymerase chain reaction (PCR), specific to Toxoplasmatinae internal transcribed spacer 1 (ITS1) of the ribosomal DNA, followed by sequencing of the purified PCR fragments. The same molecular techniques were used to determine the frequencies of *N. caninum* and *T. gondii*-infected animals. These results were compared with indirect immunofluorescent antibody tests (IFAT) for antibodies anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* in an attempt to investigate potential cross-reactions between these protozoa. A total frequency of

13.72% (14/102) was obtained for Toxoplasmatinae DNA in goat tissues. After sequencing the PCR products from all positive tissues, a frequency of 3.92% (4/102), 1.96% (2/102) and 7.84% (8/102) were obtained for *H. heydorni*, *N. caninum* and *T. gondii*, respectively. All sequences shared 98-100% identity with sequences from other strains of these coccidia present in GenBank. Although antibodies to *N. caninum* and *T. gondii* were found in 9.8% (10/102) and 21.6% (22/102) of the goats, respectively, there was no evidence of serological cross-reactions with sera from *H. heydorni* PCR-positive animals.

Keywords – *Hammondia heydorni*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, Goats, PCR.

Introduction

Since its first descriptions, as *Isospora bigemina* (Wenyon, 1926; Levine, 1973), numerous articles have been published about *Hammondia heydorni*, describing it as a coccidian parasite with an obligatory two host life cycle, with dogs and foxes as definitive hosts and a number of intermediate hosts, mostly ruminants (Dubey et al., 2002a). With the discovery of *Neospora caninum* (Dubey et al., 1988a), a major pathogen for cattle and dogs, all previous reports about *H. heydorni* were questioned since these coccidia share several phenotypical and genotypical characteristics. It was suggested that they could be synonymous species (Mehlhorn & Heydorn, 2000; Heydorn & Mehlhorn, 2002); nevertheless, several studies have proven otherwise (Ellis et al., 1999b; Mugridge et al., 1999; Dubey et al., 2002b; Monteiro et al., 2007).

Goats are intermediate hosts for *N. caninum*, *H. heydorni* and *Toxoplasma gondii*. *N. caninum* and *T. gondii* can cause abortion, stillbirth and low yielding in caprine herds while *H. heydorni* seems to be unassociated to any clinical signs to this species (Blagburn et al., 1988; Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992; Dubey et al., 1996; Figliuolo et al., 2004). Since breeding goats is a major source of economic resources in Brazil, especially in Bahia state, which concentrates almost 40% of all goats in the

country (IBGE, 2008), it is important to understand and monitor the diseases that occur in these animals, and to establish an efficient way to make the differential diagnosis between these coccidia.

However, epidemiologic studies of *H. heydorni*-like coccidian are difficult to perform because there are no serological tests available to *Hammondia* sp (Mugridge et al., 1999). It seems that the best way to differentiate these species is by means of molecular techniques (Slapeta et al., 2002a; Slapeta et al., 2002b; Sreekumar et al., 2003; Eleni et al., 2004; Monteiro et al., 2008). So, the aim of this work was to investigate the presence of *H. heydorni* in goats by nested polymerase chain reaction (PCR) of brain, tongue and heart tissues, to compare its frequency with other coccidia of known importance to this animal species, *N. caninum* and *T. gondii*, and also compare these results with indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) for antibodies anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* in an attempt to investigate the possibility of cross-reactions between these protozoa.

Materials and Methods

Samples of blood, brain, tongue and heart were collected from 102 goats, immediately after slaughtering in the city of Feira de Santana, between January, 2007 and February, 2008. The animals were from the counties of Andorinhas, Itatim, Pintadas, Itiúba and Xique-xique, located within a distance between 100 and 400 km from Feira de Santana in Bahia State, northeast of Brazil.

The entire brains, tongues and hearts were removed using knives, scissors and tweezers. In between each individual goat tissue, the implements used on samples were cleaned with sodium hypochlorite solution (2.5%) to prevent cross-contamination. Samples were stored at – 80 °C until used. The blood was processed for serum separation and stored at -20°C.

Three different tissues (tongue, heart and brain) from each animal were used for DNA extraction, resulting in a total of 306 samples. Each sample was homogenized with a pestle and mortar in liquid nitrogen and the DNA was extracted using a commercial DNA extraction kit (Easy-DNA™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. After the extraction, DNA samples were stored at -20°C until the execution of the PCR reactions.

A nested PCR reaction using two pairs of primers complementary to portions of the internal transcribe spacer 1 (ITS1) sequences conserved among *Hammondia* sp, *N. caninum* and *T. gondii* was conducted. The first reaction used the external primers JS4 (5'-CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C-3') (Slapeta et al., 2002a), that anneals to the 3' conserved region of the 18S rRNA gene and CT2b (5'-TTG CGC GAG CCA AGA CAT C-3') (Monteiro et al., 2007) that anneals to the 5' conserved region of the 5,8S rRNA gene. The second reactions used primers CT1 (5'-TGA ATC CCA AGC AAA ACA-3') and CT2 (5'-G CGC GAG CCA AGA CAT CCA T-3') (Sreekumar et al., 2003) that anneals to the 3' region of the ITS1 and to the 5' conserved region of the 5,8S rRNA gene, respectively.

Each amplification was performed in 25 µl reaction mixtures containing 0.5 µl of each of the respective primer, 12.5 µl of PCR commercial mix (Master Mix, Promega, Madison, WI), 10.5 µl of ultra-pure water and 1.0 µl of template DNA. Reactions were run in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) thermal cycler. The PCR conditions for JS4/CT2b were 40 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, and for CT1/CT2 were 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, both preceded by an initial denaturation step of 94°C for 5 min and followed by a final extension at 72°C for 7 min. The expected size of the amplicon was about 500 bp for the first reaction and 400 bp for the second one.

Positive controls consisted of DNA from *H. heydorni* oocysts obtained from a naturally infected dog (Monteiro et al., 2007), *N. caninum* tachyzoites (NC-1 strain) (Dubey et al., 1988b) and *Toxoplasma gondii* tachyzoites (RH strain). Ultra-pure water was used as negative control. An amplification experiment was considered invalid when a failure

in any of the controls occurred. A 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a marker. The PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. DNA bands corresponding to positive samples were excised with a fine scalpel blade. The amplicons were extracted from the gel using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) kit according with the manufacturer's instructions.

The PCR products were directly sequenced in the forward and reverse directions using the Big Dye terminator system, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI 3100 sequencer (AME Bioscience). The sequence chromatograms were edited using BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). BLAST searches were performed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) in order to compare the sequences with those in the public database.

The PCR products from the positive samples extracted from agarose gel were separated on 6% polyacrylamide gel in 1 X TAE buffer at 80 V for 2 hr, to verify the presence of distinct band patterns between the amplified ITS1 from *H. heydorni* and *N. caninum*. The gel was analyzed by silver staining.

Serum samples were tested for IgG antibodies anti-*T. gondii* and anti-*N. caninum* using an indirect fluorescent antibody test (IFAT) (Camargo, 1964; Dubey et al., 1988b) employing 1:16 and 1:50 as cut-off dilutions, respectively. The *T. gondii* antigen was prepared from the RH strain maintained in mice and the *N. caninum* antigen using tachyzoites from NC-1 strain cultured in VERO cells. In both tests a commercial anti-goat IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as a secondary antibody. Reactions for *N. caninum* and *T. gondii* were considered positive only when the whole tachyzoite surface was fluorescent. Every positive serum was tested to maximum dilution. Positive and negative control goat sera for both antigens were used on each slide. A comparison was made crossing the PCR and sequencing results with the presence of antibodies anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii*.

Results

The JS4/CT2b set of primers was shown to produce a PCR product of approximately 500 bp for *N. caninum*, *T. gondii*, and *H. heydorni* and a product of approximately 400 bp was produced after the second amplification with the CT1/CT2 internal primers (Figure 4). After the first amplification a band was not always seen, even if the sample were positive in the second amplification (data not shown).

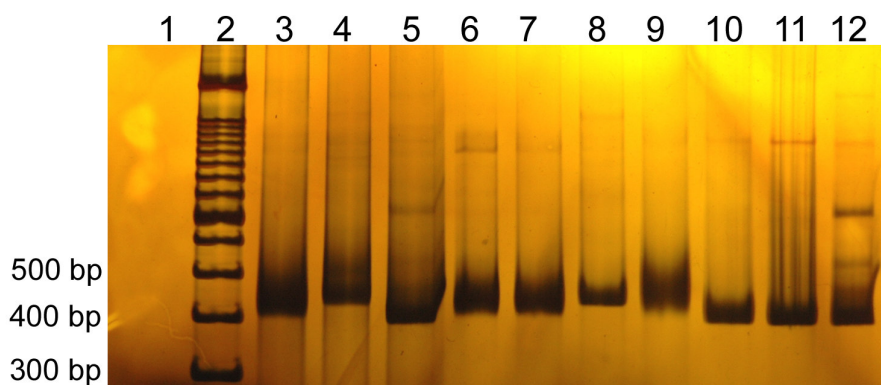


Figure 4. Amplification with JS4-CT2b/CT1-CT2 primer pairs specific for Toxoplasmatinae. Lanes: (1) Negative control; (2) 100 bp DNA ladder; (3) *Hammondia heydorni* (control DNA); (4) *Neospora caninum* NC-1 (control DNA); (5) *Toxoplasma gondii* (control DNA); (6, 7, 8) *H. heydorni* positive samples; (9) *N. caninum* positive sample; (10, 11, 12) *T. gondii* positive samples

From the total of 102 goats tested for the presence of Toxoplasmatinae DNA in three different tissues (tongue, heart or brain), a total frequency of 13.72% (14/102) was obtained. Sequencing of the PCR products after the second amplification reaction from all positive resulted in 3.92% (4/102) animals positive for *H. heydorni*, 1.96% (2/102) for *N. caninum* and 7.84% (8/102) for *T. gondii*. The sequences of each identified species shared 98-100% identity with sequences from other strains of these coccidia present in GenBank. Toxoplasmatinae DNA was detected in 2.94% of tongues, 3.92% of hearts, and 6.86% of brains. Hence, in the total of 102 tested goats there were seven instances which the brain was negative while one other tissue was positive (Table 5).

Antibodies anti-*N. caninum* were found in 9.8% (10/102) of the goats, in titers of 1:50 (five goats), 1:100 (four goats) and 1:3200 (one goat). Antibodies anti-*T. gondii* were

found in 21.6% (22/102) of the goats in titers of 1:16 (14 goats), 1:32 (five goats), 1:64 (one goat), 1:128 (one goat) and 1:1024 (one goat). Sera from one of *H. heydorni* PCR-positive animals presented anti-*T. gondii* antibodies in titer of 1:16 (Table 6).

Table 5. Toxoplasmatinae parasites in goat tissues using a nested PCR assay followed by sequencing of the PCR fragments

	Prevalence (%)	No. of positive brains (%)	No. of positive hearts (%)	No. of positive tongues (%)
<i>Hammondia heydorni</i>	4/102 (3.92)	1 (0.98)	3 (2.94)	0
<i>Neospora caninum</i>	2/102 (1.96)	2 (1.96)	0	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	8/102 (7.84)	4 (3.92)	1 (0.98)	3 (2.94)
Total	14/102 (13.72)	7/102 (6.86)	4/102 (3.92)	3/102 (2.94)

Discussion

Infections caused by *H. heydorni*, *N. caninum* and *T. gondii* were confirmed in goats using a nested PCR followed by sequencing of the ITS1 region of the parasites' rDNAs. Although goats are recognized as intermediate hosts of these parasites, there are no prevalence/frequency data available through PCR assays using goat tissues (Ellis et al., 1999b; Tenter et al., 2000; Buxton et al., 2002; Schares et al., 2002; Dubey et al., 2007). To the author's knowledge, this is the first confirmation of *H. heydorni* in tissues from naturally infected animals, and the first epidemiological study of *N. caninum* in goats with molecular confirmation of the parasite.

The sequencing data obtained from this study provide strong evidence for the presence of *H. heydorni* in the tissues of the goat population tested but, for definitive evidence of the presence of *H. heydorni*, isolation of parasites from a naturally infected host is required (Barrat et al., 2008). Some authors have described unsuccessfully attempts to isolate and maintain *H. heydorni* in cell cultures and so far there are no established protocols for the isolation of this parasite (Speer et al., 1988; Schares et al., 2003; Dubey et al., 2004).

Table 6. Results of a nested PCR and sequencing for detection of Toxoplasmatinae parasites and IFAT for detection of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies

Sample	Tissue	Anti- <i>N. caninum</i> antibodies	Anti- <i>T. gondii</i> antibodies	Sequencing result
53	Heart	Negative	Negative	<i>Hammondia heydorni</i>
54	Heart	Negative	Negative	<i>Hammondia heydorni</i>
64	Brain	Negative	1/16	<i>Hammondia heydorni</i>
137	Heart	Negative	Negative	<i>Hammondia heydorni</i>
59	Brain	Negative	Negative	<i>Neospora caninum</i>
91	Brain	1/3.200	Negative	<i>Neospora caninum</i>
66	Brain	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
83	Heart	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
87	Tongue	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
88	Brain	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
89	Tongue	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
111	Tongue	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
127	Brain	Negative	Negative	<i>Toxoplasma gondii</i>
139	Brain	Negative	1/16	<i>Toxoplasma gondii</i>

The CT1/CT2 primer pair used in the current study has been developed and employed by others to amplify DNA from Toxoplasmatinae parasites (Sreekumar et al., 2003; Dubey et al., 2004; Sreekumar et al., 2004). Considering that the use of specific primers in a conventional PCR assay may not be sensitive enough to detect *H. heydorni* (Wapenaar et al., 2006), another amplification step has been added in the present experiment with the primer pair JS4/CT2b, previously used for molecular characterization of *H. heydorni*, *H. hammondi*, *N. caninum*, *T. gondii*, and *N. huguesi* (Monteiro et al., 2007). The use of nested PCRs is known to enhance the assay sensitivity and provide more accurate data on coccidian frequency studies (Ellis et al., 1999a; Medina et al., 2006; Barrat et al., 2008), so a nested PCR assay was used in the current survey.

The molecular frequency of infection obtained for *H. heydorni* in goats was higher than that for *N. caninum*. It is possible that goats are more susceptible to *H. heydorni* infection when compared to *N. caninum*. Since there are no serological tests available for anti-*H. heydorni* antibodies, epidemiological information about infection in natural hosts is difficult to obtain (Mugridge et al., 1999). The only field study for the detection of *H. heydorni* DNA in tissues was conducted with rodents from Australia using a nested PCR assay, sensitive enough to detect DNA equivalent to 0,1 tachyzoite in 500 ng of mouse DNA, and no positive samples were found (Barrat et al., 2008). This may suggest that goats are more efficient hosts of *H. heydorni* than rodents.

Most epidemiological data targeting *N. caninum* or *T. gondii* infections in goats are conducted with serological tests, as IFAT or ELISA; molecular studies are also available, usually with investigation of stillborns or aborted fetuses (Tenter et al., 2000; Dubey & Schares, 2006; Dubey et al., 2007). A few prevalence studies were conducted using molecular techniques to investigate the frequency of *N. caninum* or *T. gondii* infection on tissue samples from other animal species. The prevalence of *N. caninum* infection was 4.61% (7/152) in red foxes (*Vulpes vulpes*) (Hurková & Modrý, 2006) and ranged from 3.0 to 39.7% in different species of rodents (Huang et al., 2004; Hughes et al., 2006; Ferroglio et al., 2007; Jenkins et al., 2007; Barrat et al., 2008), while *T. gondii* DNA was found in 4.92% (3/61) martens (*Martes* sp.), in 1.32% (2/152) red foxes (Hurková & Modrý, 2006) and in 45.5% (47/103) cats with antibodies to *T. gondii* (Montoya et al., 2008). An assay with 33 samples of brains from foxes with histological lesions suggestive of parasitic encephalitis revealed one positive sample for *T. gondii* and none for *N. caninum* DNA (Murphy et al., 2007). No samples tested positive for *T. gondii* or *N. caninum* DNA in free-ranging sika deer (*Cervus nippon*) (Omata et al., 2005) or killer whales (*Orcinus orca*) (Omata et al., 2006).

Although *N. caninum* and *T. gondii* tissue cysts are mostly found in the central nervous system, other tissues are considered suitable for the detection of these parasites, as skeletal and heart muscles, lung, and kidneys (Dubey, 1998; Dubey et al., 2002a; Dubey & Schares, 2006). It has been suggested that prevalence values of *N. caninum* infection obtained in molecular studies using only one kind of tissue can be under-representations

of the real prevalence (Huang et al., 2004; Ferroglia et al., 2007; Barrat et al., 2008). In the present work, even though all *N. caninum* PCR-positive samples were found in brains, 50% (4/8) of the *T. gondii*-positive samples and 75% (3/4) of *H. heydorni* positive samples consisted of tongue or heart tissues. It is still not known what the predilection sites for *H. heydorni* tissue cysts are. Foxes fed with esophagus, skeletal muscles, tongue, diaphragm or heart from ruminant *Gazella gazella* naturally infected with *H. heydorni* shed oocysts (Mohammed et al., 2003). In the current study *H. heydorni* was mainly detected in the heart, suggesting that field studies with this parasite should include this tissue.

The comparison between the nested PCR results with IFAT for antibodies anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* revealed different frequency values. In animals infected with *N. caninum*, antibody levels will increase during the first weeks up to 3–6 months, and may persist for the life, but they fluctuate and sometimes are below the detection limits of serological tests (Dubey & Schares, 2006). It is also possible that an infected animal presenting serological evidence of infection turns out to be negative in the PCR if the parasite DNA is absent or present in small amounts on the tissue sample chosen for analysis (Ellis et al., 1999b). The examination of more anti-*H. heydorni* sera under controlled environment research conditions may be necessary to further clarify serological cross-reactivity between *H. heydorni* and related coccidia.

Only three PCR positive animals presented antibodies either to *N. caninum* or *T. gondii* in the IFAT. In two of them there was a match between the results from both tests, but one animal that was positive for *H. heydorni* DNA presented anti-*T. gondii* antibodies in a titer of 1:16. The number of positive animals was too small to allow any inference on the possibility of cross-reactions between these protozoa and since this animal was naturally infected there is a chance that it was infected by *T. gondii* and *H. heydorni* simultaneously. Considering the infection by coccidians, it must be considered the possibility of multiple infections (Slapeta et al., 2002b; Monteiro et al., 2007)

Since its first reports as *I. bigemina*, much information has been published on *H. heydorni*, but in most studies there is no way to be sure about the identity of the parasite

(Dubey et al., 2002a). To the author's knowledge, this is the first report of *H. heydorni* DNA in a naturally infected intermediate host. The animals analyzed were from a hot and dry region in Brazil, associated with low frequencies of *T. gondii* infection, probably due to an environment less contaminated with oocysts (Gondim et al., 1999b). Mild temperatures and humidity favor the sporulation and survival of coccidian oocysts (Dubey et al., 2007) and it is likely that other regions, with more suitable climates to the development of oocysts may have even higher frequencies of infection by *H. heydorni*.

There is a lack of information on *H. heydorni* infection in intermediate and definitive hosts. A few epidemiological surveys have been done by detecting oocysts in the feces of the definitive hosts. Many aspects of *H. heydorni* biology, epidemiology and life cycle are still unknown. More studies have to be conducted with goats and other animal species, specially using molecular techniques, in order to gather more information about this parasite and to investigate whether cross reactivity exists with related coccidia.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Rodrigo Soares for kindly supplying DNA of H.heydorni. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). M.S.A. SILVA was recipient of a fellowship from FAPESB.

References

- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; WOODS, L.W.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.4, p.365-367, 1992.
- BARRAT, J.; QASSAB, S.A.; REICHEL, M.P.; ELLISET, J.T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, 2008. No prelo.
- BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; SWANGO, L.J.; PIDGEON, G.L.; BRAUND, K.G. Further characterization of the biology of *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v.27, p.193-198, 1988.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.18, n.12, p.546-552, 2002.

CAMARGO. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6, p.117-118, 1964.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1019-1024, 1998.

DUBEY, J.P.; ACLAND, H.M.; HAMIR, A.N. *Neospora caninum* in a stillborn goat. **The Journal of Parasitology**, v.78, n.3, p.532-534, 1992.

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

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.9, p.1269-1285, 1988a.

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

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

DUBEY, J.P.; MORALES, J.A.; VILLALOBOS, P.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; TOPPER, M.J. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, n.2, p.263-265, 1996.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.240, p.1-34, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; VIANNA, M.C.B.; LINDSAY, D.S. Molecular and biological characterization of *Hammondia heydorni*-like oocysts from a dog fed hearts from naturally infected white-tailed deer. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.5, p.1174-1176, 2004.

ELENI, C.; CROTTI, S.; MANUALI, E.; COSTARELLI, S.; FILIPPINI, G.; MOSCATI, L.; MAGNINO, S. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.271–274, 2004.

ELLIS, J.T.; McMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the

detection of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1589-1596, 1999a.

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

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3-4; p.346-9, 2007.

FIGLIUOLO, L.P.C.; RODRIGUES, A.A.R.; VIANA, R.B.; AGUIAR, D.M.; KASAI, N.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, v.55, p.29-32, 2004.

GONDIM, L.F.P.; BARBOSA Jr., H.V.; RIBEIRO-FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999b.

HEYDORN, A.O.; MEHLHORN, H. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. **Parasitology Research**, v.88, p.174-184, 2002a.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, n.3, p.283-290, 2004.

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

HURKOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.150-154, 2006.

IBGE. Banco de Dados Agregados – SIDRA, Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/>>. Acessado em: 02 jul. 2008.

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

LEVINE, N.D. *Isospora bigemina* (Stiles 1891) Lühe, 1906. In: **Protozoan parasites of domestic animals and of Man**. 2.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973. p.222-223.

MEDINA, L.; CRUZ-VÁSQUEZ, C.; QUEZADA, T.; MORALES, E.; GARCÍA-VÁSQUEZ, Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, México. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p.187-191, 2006.

MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.O. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. **Parasitology Research**, v.86, p.169-178, 2000.

- MOHAMMED, O.; DAVIES, A.J.; HUSSEIN, H.S.; DASZAK, P.; ELLIS, J.T. *Hammondia heydorni* from the arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.3, p.535-539, 2003.
- MONTEIRO, R.M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.O.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, v.103, P.235-238, 2008.
- MONTEIRO, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.; SOUZA, S.L.P.; FUNADA, M.R.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KEID, L.B.; SOARES, R.M. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, v. 134, p.1195–1203, 2007.
- MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMÍREZ, C.; FUENTES, I. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from cats from Spain. **The Journal for Parasitology**, 2008. In press.
- MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.; JOHNSON, A.M.; TENTER, A.M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1545-1556, 1999.
- MURPHY, T.M.; WALOCHNIK, J.; HASSL, A.; MORIARTY, J.; MOONEY, J.; TOOLAN, D.; SANCHEZ-MIGUEL, C.; O'LOUGHLIN, A.; MCAULIFFE, A. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infections in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. **Veterinary Parasitology**, v.146, n.3-4, 2007.
- OMATA, Y.; ISHIGURO, N.; KANO, R.; MASUKATA, Y.; KUDO, A.; KAMIYA, H.; FUKUI, H.; IGARASHI, M.; MAEDA, R.; NISHIMURA, M.; SAITO, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sika deer from eastern Hokkaido, Japan. **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.2, p.454-458, 2005.
- OMATA, Y.; UMESHITA, Y.; WATARAI, M.; TACHIBANA, M.; SASAKI, M.; MURATA, K.; YAMADA, T.K. Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella*-species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.68, n.5, p.523-526, 2006.
- SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CÜPPERS, A.; MEHLHORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F.J. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. **Parasitology Research**, v.88, p.44–52, 2002.
- SCHARES, G.; MEYER, J.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J.; RIEBE, R.; BOHNE, W.; ROHN, K. PETERS, M. A *Hammondia*-like parasite from the European fox (*Vulpes vulpes*) forms biologically viable tissue cysts in cell culture. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.229–234, 2003.
- SLAPETA, J.P.; KOUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRÝ, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS

- 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v.163, p.147-154, 2002a.
- SLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.157–167, 2002b.
- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; BLIXT, J.A.; BLAGBURN, B.L. Development of *Hammondia heydorni* in cultured bovine and ovine cells. **Journal of Protozoology**, v.35, p.352-356, 1988.
- SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; FOURNET, V.M.; ROSENTHAL, B.M.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.5, p.1082-1085, 2003.
- SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; ROSENTHAL, B.M.; VIANNA, M.C.B.; VENTURINI, L.; BASSO, W.; GENNARI, S.M.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. **Experimental Parasitology**, v. 107, p.65-71, 2004.
- TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1217-1258, 2000.
- WAPENAAR, W; JENKINS, M.C.; O'HANDLEYT, R.M.; BARKEMAT, H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). **The Journal of Parasitology**, v.92, n.6, p.1270-1274, 2006.
- WENYON, C.M. Coccidia of the genus *Isospora* in cats, dogs and man. **Parasitology**, v.18, p.253–66, 1926.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Enquanto *H. heydorni* é considerado um parasito não patogênico para os seus hospedeiros, o protozoário *N. caninum*, pouco tempo após a sua classificação, foi considerado um importante agente causador de abortamentos em bovinos e responsável por prejuízos econômicos para a indústria de produção animal. As semelhanças fenotípicas e genotípicas reforçam a importância da diferenciação correta entre eles.

Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre *H. heydorni* baseadas em estudos moleculares. Além disso, a ausência de testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico da infecção por *H. heydorni* em animais torna difícil a execução de investigações epidemiológicas sobre esse parasito. A frequência da infecção por *H. heydorni* em caprinos no estado da Bahia foi determinada por meio de uma PCR *nested* específica para coccídios da subfamília Toxoplasmatinae, seguida pelo sequenciamento das amostras positivas. Com esse experimento, foi possível identificar este parasito, pela primeira vez, em tecidos de animais naturalmente infectados.

Esse experimento possibilitou também a determinação da frequência molecular de *N. caninum* e *T. gondii* em caprinos abatidos no estado da Bahia e a comparação das frequências entre os coccídios sugere que caprinos podem ser mais susceptíveis a infecção por *H. heydorni* do que por *N. caninum*.

Não foi possível verificar a presença de reações cruzadas entre os soros de animais infectados com *H. heydorni* e anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*. Muitos aspectos da biologia, epidemiologia e ciclo de vida de *H. heydorni* ainda são desconhecidos. Mais estudos devem ser conduzidos com caprinos e outras espécies animais para um maior conhecimento sobre esse parasito e para investigar a presença de reações cruzadas entre coccídios relacionados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, L.; SCHARES, G.; ORZESZKO, K.; GASSER, R.B.; ELLIS, J.T. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. **Parasitology**, v.132, p.1-6, 2006.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, v.137, p.611-613, 1995.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; WOODS, L.W.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.4, p.365-367, 1992.
- BARRAT, J.; QASSAB, S.A.; REICHEL, M.P.; ELLISET, J.T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, 2008. No prelo.
- BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.70, p.271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1497-1507, 1999.
- BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S.; SWANGO, L.J.; PIDGEON, G.L.; BRAUND, K.G. Further characterization of the biology of *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, v.27, p.193-198, 1988.
- BRUMPT, E. Coccidiés. In: BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**, 6.ed. Paris: Masson et Cie Editeurs, 1949. p.369-376.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.18, n.12, p.546-552, 2002.
- CAMARGO. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6, p.117-118, 1964.
- CORBELLINI, L.G.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p.416-419, 2001.
- COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZÊDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; ARAÚJO, F.R.; McALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P. Chickens are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.157-159, 2008.
- COSTA, M.D.M. Isosporose do cão - com a descrição de uma nova variedade (*Isospora bigemina* Stiles, 1891 *bahiensis* n. var.). **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, v.3, p.107-112, 1956.

- DE MAREZ, T.; LIDDEL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1647-1657, 1999.
- DISSANAIKE, A.S.; KAN, S.P. *Isospora heydorni*-type oocysts in faeces of a dog. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.8, p.419, 1977.
- DUBEY, J.P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.169, n.10, p.1061-1078, 1976.
- DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1019-1024, 1998.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; ACLAND, H.M.; HAMIR, A.N. *Neospora caninum* in a stillborn goat. **The Journal of Parasitology**, v.78, n.3, p.532-534, 1992.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKA, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 2002a.
- DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.9, p.1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J.P.; FAYER, R. Development of *Isospora bigemina* in dogs and other mammals. **Parasitology**, v.73, p.371-380, 1976.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J.P.; HILL, D.E.; LINDSAY, D.S.; JENKINS, M.C.; UGGLA, A.; SPEER, C.A. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species. **Trends in Parasitology**, v.18, n.2, p.66-69, 2002b.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P.; MORALES, J.A.; VILLALOBOS, P.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; TOPPER, M.J. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, n.2, p.263-265, 1996.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.240, p.1-34, 2006.

- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.
- DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; VIANNA, M.C.B.; LINDSAY, D.S. Molecular and biological characterization of *Hammondia heydorni*-like oocysts from a dog fed hearts from naturally infected white-tailed deer. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.5, p.1174-1176, 2004.
- DUBEY, J.P.; WILLIAMS, C.S.F. *Hammondia heydorni* infection in sheep, goats, moose, dogs and coyotes. **Parasitology**, v.81, p.123-127, 1980.
- DUBNÁ, S.; LANGROVÁ, I.; NÁPRAVINÍK, J.; JANKOVSKÁ, I.; VADLEJCH, J.; PEKÁR, S.; FECHTNERET, J. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.120–128, 2007.
- ELENI, C.; CROTTI, S.; MANUALI, E.; COSTARELLI, S.; FILIPPINI, G.; MOSCATI, L.; MAGNINO, S. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.271–274, 2004.
- ELLIS, J.T.; McMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1589-1596, 1999a.
- ELLIS, J.T.; MORRISON, D.A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; MOHAMMED, O.B.; RYCE, C.; DUBEY, J.P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v.118, p.357-362, 1999b.
- ELLIS, J.T.; POMROY, W.E. *Hammondia heydorni* oocysts in the faeces of a greyhound in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.51, p.38–39, 2003.
- FARIA, E. B.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, M.L.C.R.; AZEVEDO, S.S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba state. **Veterinary Parasitology**, v.149, P.126–129, 2007.
- FAYER, R. Development of *Sarcocystis fusiformis* in the small intestine of the dog. **The Journal of Parasitology**, v.60, n.4, p.660-665, 1974.
- FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3–4; p.346–9, 2007.
- FIGLIUOLO, L.P.C.; RODRIGUES, A.A.R.; VIANA, R.B.; AGUIAR, D.M.; KASAI, N.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, v.55, p.29-32, 2004.
- FONTANARROSA, M.F.; VEZZANI, D.; BASABE, J.; EIRASET, D.F. An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p.283-295, 2006.

- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. *Hammondia hammondi* gen. nov., sp. nov., from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.46, p.3–12, 1975.
- FRENKEL, J.K.; SMITH, D.D. Determination of the genera of cyst forming coccidia. **Parasitology Research**, v.91, p.384–389, 2003.
- GJERDE B. Shedding of *Hammondia heydorni*-like oocysts by foxes fed muscular tissue of reindeer (*Rangifer tarandus*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.24, n.2, p.241-243, 1983.
- GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v.22, p.247-252, 2006.
- GONDIM, L.F.P.; BARBOSA Jr., H.V.; RIBEIRO-FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273-276, 1999b.
- GONDIM, L.F.P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Variation of the ITS1 sequence within individual strains of *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, v.90, n.1, p.119-122, 2004a.
- GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004b.
- GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.1-7, 2001.
- GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; MONTEIRO JR., L.A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v.47, p.35, 1999a.
- HEYDORN, A.O.; MEHLHORN, H. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. **Parasitology Research**, v.88, p.174-184, 2002.
- HILALI, M.; FATANI, A.; AL-ATIYA, S. Isolation of tissue cysts of *Toxoplasma*, *Isospora*, *Hammondia* and *Sarcocystis* from camel (*Camelus dromedarius*) meat in Saudi Arabia. **Veterinary Parasitology**, v.58, p.353-356, 1995.
- HILALI, M.; LINDBERG, R.; WALLER, T.; WALLIN, B. Enigmatic cyst-forming sporozoan in the spinal cord of a dog. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, n.4, p.623-625, 1986.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v.66, n.4, p.411-453, 1991.
- HOLMDAHL, O.J.M.; MATTSSON, J.G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of the internal transcribed spacer 1. **Parasitology**, v.112, p.177-182, 1996.

- HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; BORST, M.V.A.; VERCAMMEN, M.; KNAPEN, F. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v.83, p.285-289, 1997.
- HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, n.3, p.283-290, 2004.
- HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.N.; TERRY, R.S.; MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, P. 29-36, 2006.
- HURKOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.150-154, 2006.
- IBGE. Banco de Dados Agregados – SIDRA, Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/>>. Acessado em: 02 jul. 2008.
- JENKINS, M.C.; ELLIS, J.T.; LIDDEL, S.; RYCE, C.; MUNDAY, B.L.; MORRISON, D.A.; DUBEY, J.P. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU rDNA sequence. **Parasitology**, v.119, p.135-142, 1999.
- JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.161-165, 2007.
- LEVINE, N.D. *Isospora bigemina* (Stiles 1891) Lühe, 1906. In: **Protozoan parasites of domestic animals and of Man**. 2.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973. p.222-223.
- LEVINE, N.D.; IVENS, V. *Isospora* species in the dog. **The Journal of Parasitology**, v.51, p.859-64, 1965.
- LINDSAY D.S.; BLACKBURN, B.L. Coccidial parasites of cats and dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.13, n.5, p.759-765, 1991.
- LINDSAY DS, SPEER CA, TOIVIO-KINNUCAN MA, DUBEY JP, BLAGBURN BL. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.103-6, 1993.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.11, p.1981-1983, 1989.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is the definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.327-333, 1999a.
- LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; POWE, T.A.; SARTIN, E.A.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats

- inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.1176-1180, 1995.
- LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1521-1523, 1999b.
- MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v.84, n.5, p.983-991, 1998.
- MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; HERNÁNDEZ, S.; LÓPEZ-COBOS, E.; BECERRA, C.; ACOSTA, I.; MARTÍNEZ-MORENO, A. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.7-13, 2007.
- MASALA, G.; PORCU, R.; DAGA, C.; DENTI, S.; CANU, G.; PATTA, C.; TOLA, S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.96-98, 2007.
- MATSUI, T. The tissue stages of *Isospora heydorni* in the guinea pig as an intermediate host. **Japanese Journal of Parasitology**, v.40, p.581-586, 1991.
- MATSUI, T.; MORII, T.; IJIMA, T.; ITO, S.; TSUNODA, K.; KOBAYASHI, F.; FUJINO, T. *Isospora heydorni* isolated in Brazil: endogenous stages in dogs. **Japanese Journal of Parasitology**, v.35, p.215-222, 1986.
- McALLISTER, M.M. *Neospora caninum*: its oocysts and its identity: an opinion. **Parasitology Research**, v.86, p.860, 2000.
- McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.
- MEDINA, L.; CRUZ-VÁSQUEZ, C.; QUEZADA, T.; MORALES, E.; GARCÍA-VÁSQUEZ, Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, México. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p.187-191, 2006.
- MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.O. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. **Parasitology Research**, v.86, p.169-178, 2000.
- MINDELL, D.P.; HONEYCUTT, R.L. Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, v.21, p.541-566, 1990.
- MOHAMMED, O.; DAVIES, A.J.; HUSSEIN, H.S.; DASZAK, P.; ELLIS, J.T. *Hammondia heydorni* from the arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.3, p.535-539, 2003.
- MONTEIRO, R.M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.O.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, v.103, P.235-238, 2008.
- MONTEIRO, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.; SOUZA, S.L.P.; FUNADA, M.R.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KEID, L.B.;

- SOARES, R.M. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. **Parasitology**, v. 134, p.1195–1203, 2007.
- MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMÍREZ, C.; FUENTES, I. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from cats from Spain. **The Journal for Parasitology**, 2008. No prelo.
- MOORE, D.P.; YANIZ, M.G.; ODEÓN, A.C.; CANOB, D.; LEUNDA, M.R.; SPÄTH, E.A.J.; CAMPERO, C.M. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja province, argentina. **Small Ruminant Research**, v. 73, p.256–258, 2007.
- MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.; JOHNSON, A.M.; TENTER, A.M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1545-1556, 1999.
- MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; JÄKEL, T.; HECKEROTH, A.R.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M. Effects of Sequence Alignment and Structural Domains of Ribosomal DNA on Phylogeny Reconstruction for the Protozoan Family Sarcocystidae. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, n.12, p.1842–1853, 2000.
- MURPHY, T.M.; WALOCHNIK, J.; HASSL, A.; MORIARTY, J.; MOONEY, J.; TOOLAN, D.; SANCHEZ-MIGUEL, C.; O'LOUGHLIN, A.; MCAULIFFE, A. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infections in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. **Veterinary Parasitology**, v.146, n.3-4, 2007.
- NAGULESWARAN, A.; HEMPHILL, A.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; SAGER, H. Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of antibodies in goats from Sri Lanka. **Veterinary Parasitology**, v.6, p. 257–262, 2004.
- NETO, J.S.; BAKER, G.A.; SOUZA, F.B. Caprinocultura de duplo propósito no Nordeste do Brasil: avaliação do potencial produtivo. Disponível em: <<http://www.cnpat.embrapa.br/users/jsneto/potenc.htm>>. Acessado em 25 jun. 2008.
- NISHIKAWA, Y.; CLAVERIA, F.G.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H. Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.64, n.2, p.161-164, 2002.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.19–27, 2002.
- OMATA, Y.; ISHIGURO, N.; KANO, R.; MASUKATA, Y.; KUDO, A.; KAMIYA, H.; FUKUI, H.; IGARASHI, M.; MAEDA, R.; NISHIMURA, M.; SAITO, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sika deer from eastern Hokkaido, Japan. **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.2, p.454-458, 2005.

- OMATA, Y.; UMESHITA, Y.; WATARAI, M.; TACHIBANA, M.; SASAKI, M.; MURATA, K.; YAMADA, T.K. Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella*-species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.68, n.5, p.523-526, 2006.
- OOI, H.K.; HUANG, C.C.; YANG, C.H.; LEE, S.H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.47-55, 2000.
- OSAWA, T.; WASTLING, J.; MALEY, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in ovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. **Veterinary Parasitology**, v.79, p.19-34, 1998.
- O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Veterinary Record**, v.121, p.563-566, 1987.
- PACHECO, R.G.; BOTELHO, G.G.; LOPES, C.W.G. Aspectos parasitológicos de *Hammondia heydorni* em cães e caprinos experimentalmente infectados. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.14, n.2, p.189-198, 1991.
- PARÉ, J.; HIETALA, K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.273-275, 1995.
- PARISH, S.M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T.E.; WEIDNER, J.P.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D.P.; LEATHERS, C.W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n.12, p.1599-1600, 1987.
- PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, v.26, n.4, p.347-351, 1996.
- PEREIRA, M.J.S.; LOPES, C.W.G. Further studies on the experimental transmission of *Hammondia heydorni* (Tadros & Laarman, 1976) Dubey, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.13, p.11-16, 1990.
- REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T.; DUBEY, J.P. Neosporosis and Hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, P.308-312, 2007.
- RIahi, H.; DARDÉ, M.L.; BOUTEILLE, B.; LEBOUTET, M.J.; PESTRE-ALEXANDRE, M. *Hammondia hammondi* cysts in cell cultures. **The Journal of Parasitology**, v.81, n.5, p.821-824, 1995.
- RODRIGUES, A.A.R.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.B.; DUBEY, J.P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.139-150, 2004.
- SAGER, H.; STEINER MORET, C.; MÜLLER, N.; STAUBLI, D.; ESPOSITO, M.; SCHARES, G.; HÄSSIG, M.; STÄRK, K.; GOTTSTEIN, B. Incidence of *Neospora caninum* and other protozoan parasites in populations of Swiss dogs **Veterinary Parasitology**, v.139, p.84-92, 2006.

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

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CÜPPERS, A.; MEHLHORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F.J. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. **Parasitology Research**, v.88, p.44–52, 2002.

SCHARES, G.; MEYER, J.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J.; RIEBE, R.; BOHNE, W.; ROHN, K. PETERS, M. A *Hammondia*-like parasite from the European fox (*Vulpes vulpes*) forms biologically viable tissue cysts in cell culture. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.229–234, 2003.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1535-1537, 2005.

SIVERAJAH, S.; RYCE, C.; MORRISON, D.A.; ELLIS, J.T. Characterization of an alpha tubulin gene sequence from *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* and their comparison to homologous genes from Apicomplexa. **Parasitology**, v.126, p.561-569, 2003.

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

SLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.157–167, 2002b.

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of sporozoites and zoites of *Hammondia heydorni*. **Journal of Protozoology**, v.36, n.5, p.488-493, 1989a.

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

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; BLIXT, J.A.; BLAGBURN, B.L. Development of *Hammondia heydorni* in cultured bovine and ovine cells. **Journal of Protozoology**, v.35, p.352-356, 1988.

SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; FOURNET, V.M.; ROSENTHAL, B.M.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Detection of *Hammondia heydorni*-like organisms and their differentiation from *Neospora caninum* using random-amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v.89, n.5, p.1082-1085, 2003.

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

- TADROS, W.; LAARMAN, J.J. *Sarcocystis* and related coccidian parasites: a brief general review, together with a discussion on some biological aspects of their life cycles and a new proposal for their classification. **Acta Leiden**, v.44, p.1–107, 1976.
- TADROS, W.; LAARMAN, J.J. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia. **Advances in Parasitology**, v.20, p.293-468, 1982.
- TENTER, A.M.; BARTAB, J.R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKID, D.W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D.A.; ANDREW THOMPSON, R.C.A.; CONRAD, P.A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, n.595–616, 2002.
- TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1217-1258, 2000.
- THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.205-209, 1989.
- UGGLA, A.; DUBEY, J.P.; LUNDMARK, G.; OLSON, P. Encephalomyelitis and Myositis in a Boxer Puppy due to a *Neospora*-like infection. **Veterinary Parasitology**, v.32, p.255-260, 1989.
- UZÊDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; FERNANDEZ, S.Y.; AYRES, M.C.C.; GONDIM, L.F.P.; ALMEIDA, M.A.O. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. **Small Ruminant Research**, v.70, p.257-259, 2007.
- VIANNA, M.C.B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v.129, p.253-257, 2005.
- WAPENAAR, W.; JENKINS, M.C.; O'HANDLEYT, R.M.; BARKEMAT, H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). **The Journal of Parasitology**, v.92, n.6, p.1270-1274, 2006.
- WENYON, C.M. Coccidia of the genus *Isoospora* in cats, dogs and man. **Parasitology**, v.18, p.253–66, 1926.
- YAMAGE, M.; FLETCHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **The Journal of Parasitology**, v.82, n.2, p.272-279, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)