

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

**DETERMINAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OOCISTOS DE *Neospora caninum***  
**MANTIDOS POR TEMPO PROLONGADO.**

**ROSÂNGELA SOARES UZÊDA**

**SALVADOR-BAHIA**  
**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ROSÂNGELA SOARES UZÊDA**

**DETERMINAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OOCISTOS DE *Neospora caninum*  
MANTIDOS POR TEMPO PROLONGADO.**

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. Luís Fernando Pita Gondim**

**SALVADOR-BAHIA  
2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Uzêda, Rosângela Soares

Determinação da infectividade de oocistos de *Neospora caninum* mantidos por tempo prolongado/Rosângela Soares Uzêda. – Salvador, 25/05/2007. 47p.

Dissertação (Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de  
Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Pita Gondim

Palavras-chave – *Neospora caninum*, Gerbil, infectividade, oocistos.

1-Uzêda, Rosângela Soares 2-Coccidiose 3-Neosporose I- Determinação da infectividade de oocistos de *Neospora caninum* mantidos por tempo prolongado.

**DETERMINAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OOCISTOS DE *Neospora caninum*  
MANTIDOS POR TEMPO PROLONGADO.**

**ROSÂNGELA SOARES UZÊDA**

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

Salvador, 25 de maio de 2007.

Comissão Examinadora:

---

**Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim – Universidade Federal da Bahia  
Orientador**

---

**Prof. Dr. Maria Emília Bávila – Universidade Federal da Bahia**

---

**Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini – Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Aos meus pais, Crispiniana e Ildfonso (*in memorian*), exemplos de força, coragem e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

Aos meus pais , “*Seu Zé e Pixixinha*” por todo incentivo durante a minha trajetória;

À Jennifer, por todo amor e carinho nesses dez anos de felicidade e cumplicidade;

Ao meu sobrinho William, alegria constante em nossos dias;

Ao meu irmão Luis, por ser um exemplo de trabalho e vitória;

À Vânia, minha segunda mãe e companheira inseparável em todos os momentos;

Aos melhores amigos que alguém poderia ter: Ana, Dam, Suinha, Quê, Xará, Nanny, Suzy, Martinha, Sandy e Binho;

Ao meu orientador, por todo apoio, conversas e grande amizade construída;

Ao Dr. Milton McAllister, por sua contribuição e participação nesse trabalho;

Ao Dr. Paulo Maiorka (USP) pelo grande auxílio com a avaliação histopatológica;

À Professora Ângela Ornelas, por todo apoio e orientação, e por ser sempre o nosso oráculo;

Ao Professor Hélio, meu grande amigo e eterno orientador;

Aos amigos de laboratório: Alexandre, Drico, Shell, Mari, Katty, Sara Lee, Amanditas, Babi, Alan, Tati e Saulo por todo auxílio e momentos incríveis de trabalho e descontração;

Ao Dr. Ademilton e Dona Gilda pela convivência inesquecível no Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais durante esses anos;

À FAPESB pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela bolsa de Mestrado;

A todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante a realização desse trabalho.

*Existem pessoas em nossas vidas  
que nos deixam felizes pelo simples fato  
de terem cruzado nossos caminhos...*

**Meus sinceros agradecimentos!!!**

“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ...”

(Martin Luther King)



## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Histórico e classificação de <i>Neospora caninum</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Biologia de <i>N. caninum</i> .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Formas evolutivas .....	5
2.2.2 Ciclo de vida de <i>N. caninum</i> .....	8
<b>2.3 Mecanismos de infecção de <i>N. caninum</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Espécies animais acometidas .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Patogênese .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Aspectos imunológicos envolvidos na patogênese da neosporose .....</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Aspectos epidemiológicos da neosporose.....</b>	<b>17</b>
<b>2.8 Sinais Clínicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.9 Diagnóstico .....</b>	<b>18</b>
2.9.1 Diagnóstico sorológico.....	18
2.9.2 Diagnóstico Histopatológico e Imuno-histoquímico. ....	20
2.9.3 Diagnóstico molecular.....	21
<b>2.10 Caracterização dos oocistos de <i>N. caninum</i>.....</b>	<b>21</b>
2.10.1 Aspectos morfológicos .....	21
2.10.2 Diferenciação de outros coccídeos.....	22
2.10.3 Resistência no ambiente .....	23
2.10.4 Frequência e quantidade excretada .....	24
<b>2.11 Bioensaio em animais de laboratório.....</b>	<b>25</b>

<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>28</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> . A- Oriundo de lavado peritoneal de gerbil (coloração: Giemsa); B- Cérebro (coloração: hematoxilina e eosina); C- Cérebro (imuno-histoquímica). .....	6
Figura 2. Bradizoítos encistados de <i>Neospora caninum</i> em cortes de cérebro. A – Coloração: hematoxilina e eosina. B - Imuno-histoquímica. ....	7
Figura 3. Oocistos de <i>N. caninum</i> . A- Oocisto não esporulado. B- Oocisto esporulado contendo dois esporocistos. ....	8
Figura 4. Ciclo de vida silvestre e doméstico de <i>N. caninum</i> incluindo os animais cuja participação no ciclo foi confirmada experimentalmente. ....	9
Figura 5. Gerbil ( <i>Meriones unguiculatus</i> ). ....	25

**LISTA ABREVIATURAS**

bp	-Pares de base
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IFI	-Imunofluorescência Indireta
IFN $\gamma$	-Interferon gama
IL-10	-Interleucina 10
IL-12	-Interleucina 12
IL-4	-Interleucina 4
IL-5	-Interleucina 5
PBS	-Tampão fosfato
PCR	-Reação de Polimerase em Cadeia
SNC	-Sistema Nervoso Central
Th-1	-Resposta imune de células T auxiliares do Tipo 1
Th-2	- Resposta imune de células T auxiliares do Tipo 2
TNF $\alpha$	-Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
VERO	-Células Renais do Macaco Verde Africano

UZÊDA, RS. **Determinação da infectividade de oocistos de *Neospora caninum* mantidos por tempo prolongado.** Salvador, Bahia, 2007. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Tropicós) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2007.

## RESUMO

*Neospora caninum* é um protozoário coccídeo responsável por grandes prejuízos econômicos no rebanho bovino. Os animais podem infectar-se por via transplacentária ou por via horizontal, esta última caracterizada pela ingestão de oocistos esporulados ou tecidos contendo cistos do parasito. Pouco se sabe acerca das características biológicas dos oocistos de *N. caninum* e quanto tempo os mesmos podem permanecer viáveis no solo e causar infecção nos animais. O presente trabalho teve como objetivo determinar se oocistos de *N. caninum*, que foram produzidos em cães há 46 meses e mantidos à 4°C, continuam infectantes. Utilizou-se o gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental, pois gerbis são susceptíveis à infecção oral com oocistos do parasito. Seis gerbis foram inoculados por via oral com doses de 400 e 1200 oocistos esporulados de *N. caninum* e outros seis animais receberam oralmente solução de fosfato tamponada (PBS), constituindo o controle negativo. Após dois meses de observação os animais foram sacrificados, sangue e amostras de tecido nervoso foram colhidos para avaliação laboratorial. Não foram encontrados anticorpos anti-*N.caninum* segundo a técnica de imunofluorescência indireta. A avaliação histopatológica não revelou lesões características de infecção pelo protozoário e não houve amplificação de fragmento de gen NC-5 de *N. caninum* por meio da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia. Portanto, oocistos de *N. caninum* mantidos por 46 meses não permanecem viáveis para causar infecção em gerbis.

**Palavras-chave** – *Neospora caninum*, Gerbil, infectividade, oocistos.

UZÊDA, RS. **Determination of viability of *Neospora caninum* oocysts preserved for prolonged time.** Salvador, Bahia, 2007. 47p. Dissertation (Master of Animal Science in the Tropics) - School of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, 2007.

### ***SUMMARY***

*Neospora caninum* is a protozoan parasite which causes important economic losses in cattle. Animals can be infected transplacentally or by horizontal route that is characterized by the ingestion of sporulated oocysts of the parasite. Little is known about the biological characteristics of *N. caninum* oocysts and how much time they can remain viable in the environment to cause infection in the animals. The aim of this study was to determine whether *N. caninum* oocysts produced in dogs and stored for 46 months at 4°C remained infective. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) were used as experimental model because they are susceptible to oral infection with oocysts. Six gerbils were orally inoculated with doses of 400 and 1200 sporulated *N. caninum* oocysts and other six animals received phosphate solution buffer (PBS) as negative controls. After two months, animals were sacrificed; blood and tissue samples were harvested for laboratorial evaluation. Antibodies against *N. caninum* were not detected using the indirect immunofluorescence antibody test. The histopathological evaluation did not show characteristic protozoan lesions and there was not amplification of *N. caninum* NC-5 gen fragment by polymerase chain reaction. Therefore, *N. caninum* oocysts stored for 46 months do not remain viable to cause infection in gerbils.

Keywords: *Neospora caninum*, Gerbil, infectivity, oocysts.

## 1 INTRODUÇÃO

Um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* foi observado em cães e bezerros com lesões neurológicas (BJERKAS *et al.*, 1984; O'TOOLE e JEFFREY, 1987; PARISH *et al.*, 1987). A partir dessas observações, Dubey *et al.* (1988a; 1988b) investigaram e detectaram o mesmo protozoário em tecidos de cães, classificando-o como *Neospora caninum*.

*N. caninum* vem sendo intensivamente estudado por ter emergido como um importante agente causador de abortamentos em bovinos, refletindo em grandes perdas econômicas na produção animal (DUBEY e LINDSAY, 1996; ANDERSON *et al.*, 2000). Este protozoário infecta um amplo espectro de hospedeiros, sendo diagnosticado em bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos e espécies silvestres (DUBEY, 2003; GONDIM, 2006).

*N. caninum* possui características ultra-estrutural e filogenética mais próximas de *Hammondia heydorni* do que de *T. gondii*, além disso, *N. caninum* e *H. heydorni* compartilham do mesmo hospedeiro final, o cão, que uma vez infectado, excreta oocistos morfologicamente semelhantes (ELLIS *et al.*, 1999b; SCHARES *et al.*, 2001b; SLAPETA *et al.*, 2002). Contudo, a denominação de *N. caninum* foi questionada por alguns autores, os quais alegaram que o novo protozoário deveria ser classificado dentro de gêneros já existentes como *Hammondia* ou *Toxoplasma* (MEHLHORN e HEYDORN, 2000). Ellis *et al.* (1999b) demonstraram que *N. caninum* e *H. heydorni* são filogeneticamente distintos.

O parasito *N. caninum* apresenta um ciclo de vida heteroxeno e tem como hospedeiros definitivos, identificados até o momento, o cão e o coiote (*Canis latrans*) e uma grande variedade de animais domésticos e silvestres como hospedeiros intermediários. Este protozoário apresenta três estágios evolutivos infectantes, taquizoítos e bradizoítos, encontrados nos tecidos, e esporozoítos contidos nos oocistos que são excretados nas fezes dos hospedeiros definitivos (McALLISTER *et al.*, 1998a; DUBEY, 2003; GONDIM *et al.*, 2004c).

As transmissões vertical e horizontal desempenham importantes papéis na infecção, especialmente em bovinos. A primeira, na qual a mãe propaga a infecção para o feto por via transplacentária, é responsável pela manutenção da infecção em rebanhos. Na segunda, os

hospedeiros adquirem a infecção por meio da ingestão de alimento contaminado com oocistos ou pela ingestão de tecidos contendo cistos do parasito. Em bovinos o principal sinal clínico é o abortamento, enquanto que os cães apresentam mais comumente sinais neurológicos (DUBEY e LINDSAY, 1996).

O diagnóstico de infecção por *N. caninum* baseia-se na observação de lesões características dos fetos abortados associados a testes de imuno-histoquímica ou Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e na avaliação sorológica, por técnicas de imunofluorescência indireta, ensaios imunoenzimáticos, aglutinação direta e imunoblotting.

Com aproximadamente duas décadas da descoberta de *N. caninum*, pouco foi estudado sobre o oocisto, que corresponde a um importante estágio de transmissão do parasito. O conhecimento da ultra-estrutura e características antigênicas e moleculares dos oocistos, esporocistos e esporozoítos de *N. caninum* ainda é incipiente, possivelmente em virtude da dificuldade na visualização de oocistos nas fezes e da reduzida quantidade do parasito excretada pelos hospedeiros definitivos, seja em infecções naturais ou experimentais (McALLISTER *et al.*, 1998a; LINDSAY *et al.*, 1999b; BASSO *et al.*, 2001; DIJKSTRA *et al.*, 2001; LINDSAY *et al.*, 2001a; SCHARES *et al.*, 2001b; GONDIM *et al.*, 2002; SLAPETA *et al.*, 2002; McGARRY *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004).

Várias lacunas ainda existem no estudo da biologia deste coccídeo, destacando-se a falta de pesquisas sobre a viabilidade e a sobrevivência de oocistos de *N. caninum* após ser excretado pelo hospedeiro definitivo. Não se sabe se oocistos podem permanecer infectantes no meio ambiente por longos períodos de tempo. Muitas informações obtidas em estudos com *T. gondii* são utilizadas para compreender a biologia de *N. caninum*, ressaltando-se que oocistos de *T. gondii* podem permanecer infectantes por meses em suspensões fecais ou amostras de solo úmido (DUMETRE e DARDÉ, 2003).

Gerbil (*Meriones unguiculatus*) é um roedor que tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da neosporose, uma vez que esta espécie é altamente susceptível a doença. Dubey e Lindsay (2000) demonstraram a susceptibilidade dos gerbis à infecção por *N. caninum* por meio da inoculação oral com oocistos do parasito. Além disso, há outros relatos demonstrando a susceptibilidade deste roedor ao coccídeo (CUDDON *et al.*, 1992; GONDIM *et al.*, 1999a; BASSO *et al.*, 2001; RAMAMOORTHY *et al.*, 2005).



Pela necessidade de investigar parte da biologia de *N. caninum*, especialmente sobre a sobrevivência dos oocistos do parasito, utilizou-se nesse estudo oocistos de *N. caninum* produzidos em cães infectados experimentalmente e mantidos em solução sulfúrica a 2%, à 4°C por 46 meses (GONDIM *et al.*, 2002) para infectar gerbis e assim verificar a viabilidade dos mesmos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico e classificação de *Neospora caninum*

Bjerkas *et al.* (1984) observaram um parasito muito semelhante ao *T. gondii*, que estava associado a lesões inflamatórias extensas e necrose no sistema nervoso central (SNC) e músculo esquelético de seis filhotes de uma cadela da raça Boxer. Os animais não apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* segundo o teste Sabin Feldman, contudo evidenciaram paralisia dos membros posteriores, sinal que não é comumente encontrado em animais com toxoplasmose. Além disso, apresentavam cistos morfologicamente distintos de *T. gondii*, localizados restritamente no SNC.

Um caso semelhante ao relatado por Bjerkas *et al.* (1984) foi descrito em um cão Greyhound, de três meses de idade, com sinais de movimentos irregulares e atrofia muscular dos membros posteriores. Na avaliação histopatológica e ultra-estrutural foram encontrados cistos contendo organismos de forma lunar semelhantes aos de *T. gondii*, todavia a reação de imunohistoquímica foi negativa para esse protozoário. Com base nas observações foi sugerido que se tratava de um coccídeo, entretanto devido a não realização de infecção experimental e avaliação sorológica não foi possível relacionar o parasito encontrado com qualquer outro coccídeo conhecido (HILALI *et al.*, 1986).

Em 1987, O'Toole e Jeffrey (1987) descreveram um caso de encefalomielite associada à infecção por protozoário em um bezerro que apresentou sinais neurológicos logo após o nascimento e que veio a óbito com cinco dias de vida. Parasitos indistinguíveis ultra-estruturalmente de *T. gondii* foram encontrados associados às lesões, os quais reagiram fracamente com anticorpos anti-*Sarcocystis* e negativamente para anticorpos anti-*Toxoplasma* na imuno-histoquímica.

Parish *et al.* (1987) também descreveram encefalomielite associada à presença de cistos de protozoário no tecido cerebral de quatro bezerros. A avaliação sorológica foi realizada em apenas dois dos bezerros e em suas respectivas mães, sendo que os animais testados não apresentaram anticorpos contra *Toxoplasma* ou *Sarcocystis*. A identificação do parasito não foi realizada, uma vez que as formas encontradas não foram avaliadas ultra-estruturalmente.

Tecidos conservados de cães com diagnóstico de toxoplasmose foram reavaliados por Dubey *et al.* (1988a) sendo que em dez do total de 23 casos, foram observados estágios de um parasito distinto estruturalmente e não reativos a anticorpos anti-*T.gondii* no teste imunohistoquímico. Estes autores denominaram o novo parasito de *Neospora caninum*, uma nova espécie do filo Apicomplexa.

No mesmo ano de sua classificação, *N. caninum* foi isolado pela primeira vez em cultivo celular a partir de tecidos de cinco cães que apresentaram paresia dos membros posteriores (DUBEY *et al.*, 1988b), o que possibilitou a elaboração de um ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*.

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

## **2.2 Biologia de *N. caninum***

### **2.2.1 Formas evolutivas**

Os taquizoítos (Figura 1) correspondem ao estágio de multiplicação rápida, apresentam forma ovóide, globular ou lunar e medem aproximadamente 3-7 por 1-5  $\mu\text{m}$ , a depender do estágio de divisão (DUBEY *et al.*, 2002a; DUBEY, 2003).

Tratando-se de um parasito intracelular, o mesmo é capaz de invadir células nucleadas, sendo que a penetração na célula do hospedeiro se dá por invasão ativa e pode ocorrer dentro de cinco minutos de contato do taquizoíto com a célula (HEMPHILL *et al.*, 1996). Os taquizoítos localizam-se dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula e proliferam-se por endodiogenia, produzindo um grande número de novos parasitos em poucos dias (DUBEY e LINDSAY, 1996; HEMPHILL, 1999).

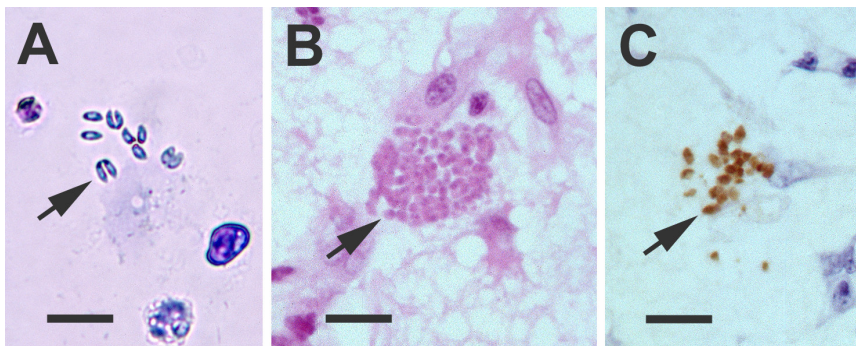


Figura 1. Taquizoítos de *Neospora caninum*. A- Oriundo de lavado peritoneal de gerbil (coloração: Giemsa); B- Cérebro (coloração: hematoxilina e eosina); C- Cérebro (imuno-histoquímica). (Cortesia: Dr. Luís F. P. Gondim). Barra: 20  $\mu$ m.

Taquizoítos têm sido identificados em diversos tipos celulares, incluindo células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY e LINDSAY, 1996).

A presença dos taquizoítos e sua rápida multiplicação ocorre na fase aguda da infecção, e a interconversão entre taquizoítos e bradizoítos é fundamental no estabelecimento da infecção crônica e na recrudescência da mesma, o que depende de fatores imunológicos do hospedeiro (LYONS *et al.*, 2002).

Os bradizoítos constituem-se na forma de multiplicação lenta do parasito, originando cistos teciduais, os quais causam infecção latente no hospedeiro (JARDINE, 1996; HEMPHILL *et al.*, 1999). Os bradizoítos são delgados, medem 6-8 por 1-1,8  $\mu$ m e contém as mesmas organelas que os taquizoítos (DUBEY e LINDSAY, 1996). Sua constituição e localização dentro do cisto tecidual (Figura 2) determinam a sua maior resistência à ação do suco gástrico.

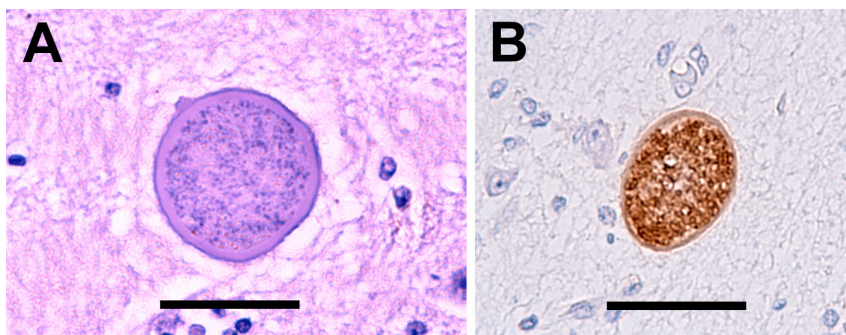


Figura 2. Bradizoítos encistados de *Neospora caninum* em cortes de cérebro.

A – Coloração: hematoxilina e eosina. B - Imuno-histoquímica. (Cortesia: Dr. Luís F. P. Gondim). Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

Há pouca informação a respeito da ultra-estrutura dos cistos teciduais e bradizoítos de *N. caninum* em função da escassez de cistos encontrados em animais naturalmente infectados (SPEER *et al.*, 1999). Os cistos são observados no tecido nervoso, mas podem ser encontrados em tecido muscular de bovinos e cães naturalmente infectados com *N. caninum* (PETERS *et al.*, 2001a).

O cisto tem a forma oval ou elíptica, podendo medir até 107  $\mu\text{m}$  (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY e LINDSAY, 1996). Sua parede possui uma espessura de meio a quatro micrômetros (DUBEY e LINDSAY, 1996; JARDINE, 1996; SPEER *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2002a) e apresenta contorno ondulado sem septos ou parede secundária (SPEER *et al.*, 1999; DUBEY *et al.*, 2002a).

Os oocistos de *N. caninum* (Figura 3) apresentam-se na forma esférica ou sub-esférica e medem aproximadamente de 10 a 11  $\mu\text{m}$  (McALLISTER *et al.*, 1998a). Possuem parede lisa e incolor com espessura de 0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$ . Os oocistos, quando esporulados, possuem dois esporocistos elipsoidais com 7,4-9,4 por 5,6-6,4  $\mu\text{m}$  (LINDSAY *et al.*, 1999b; DUBEY *et al.*, 2002a) e cada esporocisto contém quatro esporozoítos, de forma alongada e medindo 5,8-7,0 por 1,8-2,2  $\mu\text{m}$  e morfologia semelhante ao bradizoíto e taquizoíto (DUBEY *et al.*, 2002a). [Maiores detalhes acerca dos oocistos de *N. caninum* encontram-se no ítem 2.9, “Caracterização dos oocistos de *N. caninum*”].

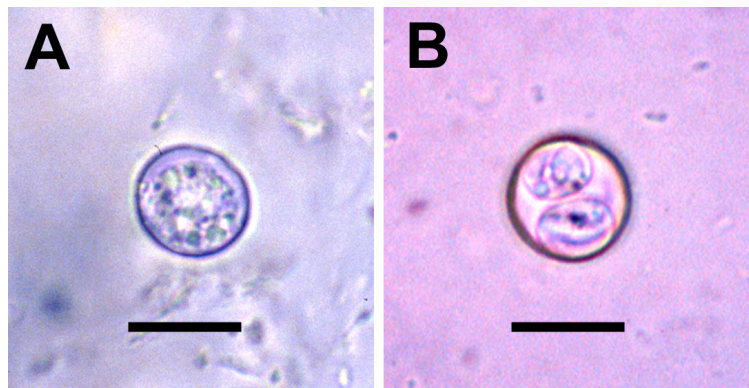


Figura 3. Oocistos de *Neospora caninum*. A- Oocisto não esporulado. B- Oocisto esporulado contendo dois esporocistos. (Cortesia: Dr. Luís F. P. Gondim). Barra: 10  $\mu$ m.

### 2.2.2 Ciclo de vida de *N. caninum*

Antes da elucidação do ciclo de vida de *N. caninum*, (Figura 4) especulava-se que seu hospedeiro definitivo fosse um carnívoro. Para investigar o ciclo do parasito, McAllister *et al.* (1998a) alimentaram quatro cães da raça Beagle com tecidos de camundongos infectados experimentalmente. As fezes dos cães foram analisadas por 30 dias, sendo que três dos quatro animais excretaram oocistos com morfologia de esférica a sub-esférica, os quais esporularam com três dias e continham dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Esses oocistos foram inoculados oralmente em camundongos com genes nocauteados para expressão de interferon gama (IFN $\gamma$ ) os quais tornaram-se infectados.

Mais tarde, Lindsay *et al.* (1999a) confirmaram os achados acima, induzindo a excreção de oocistos do parasito em dois cães alimentados com tecido nervoso de camundongos contendo cistos de *N. caninum*.

O primeiro relato de excreção de oocistos do coccídeo por um cão naturalmente infectado foi descrito por Basso *et al.* (2001). Outros casos de excreção natural de oocistos do parasito foram relatados por Slapeta *et al.* (2002) e McGarry *et al.* (2003).

A possibilidade de raposas serem hospedeiros definitivos de *N. caninum* foi avaliada por Almeria *et al.* (2002) os quais examinaram amostras de fezes de 122 raposas de vida livre e não observaram oocistos nas amostras testadas. Porém, esses autores acrescentaram que são

necessários mais estudos a fim de investigar se raposas são hospedeiros definitivos de *N. caninum*.

Ainda com o objetivo de verificar o papel de raposas no ciclo do parasito, Schares *et al.* (2002) infectaram raposas e cães com tecidos de ovinos e caprinos previamente inoculados com *N. caninum* e observaram que dos cinco cães infectados, dois eliminaram oocistos do protozoário, enquanto que nenhuma das raposas testadas excretou oocistos.

Além dos cães, coiotes (*Canis latrans*) podem eliminar oocistos de *N. caninum*, como descrito por Gondim *et al.* (2004c) que, ao alimentarem quatro coiotes jovens com tecidos de bezerros infectados experimentalmente com taquizoítos e oocistos de *N. caninum*, observaram que entre o 8<sup>o</sup> e o 10<sup>o</sup> dia da infecção oral, um coioote eliminou cerca de 500 oocistos do parasito, os quais foram confirmados por PCR (GONDIM *et al.*, 2004c).

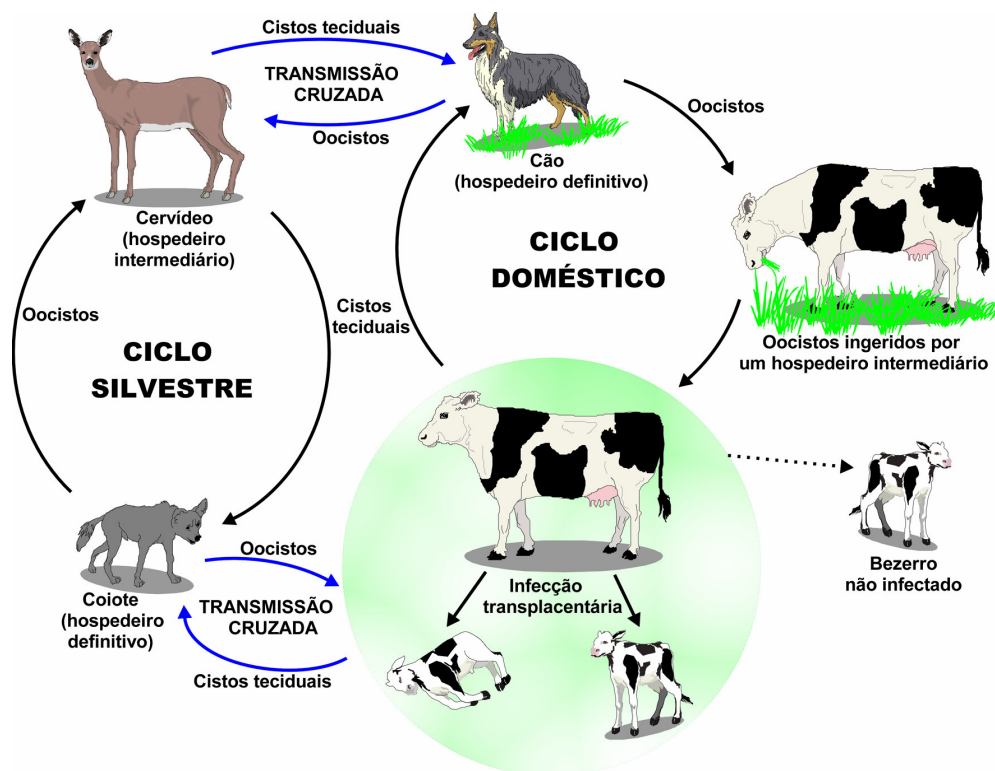


Figura 4. Ciclo de vida silvestre e doméstico de *Neospora caninum* incluindo os animais cuja participação no ciclo foi confirmada experimentalmente. (Cortesia: Dr. Luis F. P. Gondim)

### 2.3 Mecanismos de infecção de *N. caninum*

A transmissão de *N. caninum* é eficientemente realizada em bovinos. A transferência do parasito da mãe para o feto (transmissão vertical ou congênita) e ingestão de alimento contaminado por oocistos do parasito (transmissão horizontal ou pós-natal) são importantes vias de infecção (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Trees e Williams (2005) propuseram a utilização dos termos exógeno e endógeno para descrever a origem da infecção transplacentária. A transmissão transplacentária exógena demonstra que a infecção fetal originou-se a partir da ingestão de oocistos pela vaca, enquanto que a transmissão transplacentária endógena reflete a recrudescência de infecção persistente da vaca com a conseqüente passagem do parasito para o feto.

Muitos estudos revelam a grande importância da via transplacentária para a manutenção da doença entre as gerações dos hospedeiros intermediários do parasito. Essa via de infecção pode levar ao abortamento, entretanto, na maioria dos casos de infecção vertical em bovinos, bezerros nascem clinicamente saudáveis (DUBEY *et al.*, 1992b; ANDERSON *et al.*, 1997; BARBER e TREES, 1998; GONDIM *et al.*, 2004b; DUBEY *et al.*, 2006; HECKEROTH e TENTER, 2007).

A transmissão horizontal constitui também uma importante via de infecção de *N. caninum*, pois observa-se a forte associação entre a presença de cães e ocorrência da neosporose em bovinos (McALLISTER, 1999; GUIMARAES *et al.*, 2004; CORBELLINI *et al.*, 2006b). Modelos matemáticos demonstraram que a transmissão horizontal, mesmo em baixos níveis, tem importante papel na manutenção da infecção em rebanhos bovinos leiteiros (FRENCH *et al.*, 1999), uma vez que oocistos excretados por um único cão, infectado experimentalmente com tecidos de bezerro contaminados com *N. caninum*, têm o potencial de infectar um grande número de bovinos (GONDIM *et al.*, 2002).

Os cães podem infectar-se após a ingestão de restos de placenta ou aborto contendo o parasito e excretar oocistos, os quais esporulam no ambiente e podem servir de fonte de infecção para os hospedeiros definitivos e intermediários (McALLISTER, 1999; DUBEY, 2003; DUBEY *et al.*, 2006). Dijkstra *et al.* (2001) alimentaram três cães com placentas de uma vaca soropositiva para *N. caninum* e detectaram oocistos do parasito nas fezes dos mesmos,



sugerindo que a infecção dos hospedeiros definitivos pode ocorrer com a ingestão de material de aborto contaminado pelo protozoário. Posteriormente os mesmos autores, avaliando rebanhos com evidência de infecção pós-natal, sugeriram que cães podem se tornar infectados ingerindo placenta associada a fluidos fetais de vacas infectadas, e podem ainda ocasionar infecção de bovinos pela excreção de oocistos do parasito (DIJKSTRA *et al.*, 2002).

O primeiro estudo que evidencia a transmissão horizontal de *N. caninum* em bovinos, após a descoberta do hospedeiro definitivo, foi realizado por De Marez *et al.* (1999) no qual sete bezerros foram inoculados oralmente com  $10^4$ - $10^5$  oocistos de *N. caninum*, e após aproximadamente 80 dias, foram sacrificados. Lesões não foram encontradas nos tecidos pela avaliação histopatológica, contudo foi detectado DNA de *N. caninum* pela PCR em todos os animais inoculados.

A transmissão cíclica entre bovinos e cães foi demonstrada por Gondim *et al.* (2002) que infectaram bezerros com oocistos de *N. caninum* e posteriormente alimentaram cães com tecidos destes animais. Os cães infectaram-se e excretaram oocistos do parasito, os quais foram utilizados para infectar outro bezerro, que foi sacrificado e seus tecidos induziram um outro cão a excretar oocistos de *N. caninum*.

Uma vez infectadas pelo parasito, por via horizontal, vacas podem transmitir o parasito por via transplacentária. Essa possibilidade foi confirmada por Gondim *et al.* (2005) quando inocularam oocistos de *N. caninum* em vacas em diferentes estágios de gestação e observaram a ocorrência de aborto e infecção nos fetos.

#### **2.4 Espécies animais acometidas**

Anticorpos anti-*N. caninum* têm sido detectados em uma grande variedade de espécies animais, porém em algumas dessas ainda não houve a confirmação da infecção pelo parasito (DUBEY *et al.*, 2002b; BRESCIANI *et al.*, 2007) e em outros casos, o parasito foi identificado, porém sem causar doença (BARR *et al.*, 1995; PARE *et al.*, 1995; REICHEL e DRAKE, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997; OSAWA *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 1999b; FIGLIUOLO *et al.*, 2004; NAGULESWARAN *et al.*, 2004; GUIMARAES *et al.*, 2004;

GENNARI *et al.*, 2005; CORBELLINI *et al.*, 2006b; KOIWAI *et al.*, 2006; HECKEROTH e TENTER 2007).

Relatos de neosporose têm sido observados em um número crescente de espécies animais domésticas, a exemplo de cães (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY *et al.*, 1988b; GONDIM *et al.*, 2001; McINNES *et al.*, 2006a), bovinos (THILSTED e DUBEY, 1989; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; CHEAH *et al.*, 2004; CORBELLINI *et al.*, 2006a), bubalinos (RODRIGUES *et al.*, 2004), ovinos (HASSIG *et al.*, 2003) e caprinos (BARR *et al.*, 1992; DUBEY *et al.*, 1992a; CORBELLINI *et al.*, 2001; ELENI *et al.*, 2004).

Espécies silvestres também são susceptíveis à neosporose. A doença foi primeiramente relatada e um cervo (*Odocoileus hemionus columbianus*) de vida livre encontrado morto (WOODS *et al.*, 1994). Peters *et al.* (2001b) descreveram casos da doença em antílopes (*Tragelaphus imberbis*) oriundos de um zoológico da Alemanha. A presença do parasito também foi descrita em outros estudos envolvendo cervídeos (DUBEY *et al.*, 1996; SOLDATI *et al.*, 2004; VIANNA *et al.*, 2005), raccons (LEMBERGER *et al.*, 2005), raposas (LINDSAY *et al.*, 2001b; ALMERIA *et al.*, 2002; HURKOVA e MODRY, 2006), lobos (VITALIANO *et al.*, 2004), além de outras espécies silvestres (GONDIM, 2006).

Recentemente, foi relatada a excreção de oocistos por cães após consumirem tecidos de um cervídeo naturalmente infectado por *N. caninum*, demonstrando a participação de cervídeos no ciclo silvestre do protozoário, o que associado a descoberta do coiote como hospedeiro definitivo, comprova a existência do ciclo do parasita entre animais silvestres (GONDIM *et al.*, 2004a; c).

*N. caninum* também foi identificado em ratos (*Rattus norvegicus*). Neste estudo, do total de 55 ratos oriundos de propriedades rurais, nove foram positivos para anticorpos anti-*N. caninum*, além disso DNA do parasito foi identificado em dois animais soropositivos (HUANG *et al.*, 2004b). Jenkins *et al.* (2007) detectaram *N. caninum* por PCR em ratos e camundongos de vida livre (*Mus musculus*) naturalmente infectados. Este achado é relevante, uma vez que ratos e camundongos são animais cosmopolitas, e quando predados por outras espécies, podem estar veiculando a infecção pelo protozoário para outras regiões (GONDIM, 2006).

## 2.5 Patogênese

*N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, o qual utiliza como mecanismo de invasão a penetração na célula hospedeira por meio de um processo ativo, o que envolve receptores e uma série de proteínas produzidos por organelas do protozoário (DOBROWOLSKI e SIBLEY, 1996; HEMPHILL, 1999; HOWE e SIBLEY, 1999; BUXTON *et al.*, 2002).

O complexo processo de invasão celular realizado por protozoários apicomplexa parece ser similar entre os parasitos deste filo e pode ser caracterizado em três etapas: 1) o reconhecimento da membrana celular hospedeira e ligação na mesma por meio de seus receptores; 2) a invasão ativa do parasito; 3) a multiplicação do parasito no interior da célula (HEMPHILL, 1999).

Inicialmente, taquizoítos de *N. caninum* se ligam em qualquer parte da superfície celular hospedeira, por meio de proteínas imunodominantes. Em seguida, há uma reorientação do taquizoíto de forma tal que a terminação apical se posicione contra a membrana. Com auxílio de estruturas do parasito como conoide e micronemas, as membranas plasmáticas da célula e do protozoário se unem no sítio de contato, enquanto há excreção de proteínas pelo protozoário. A membrana celular se retrai e o parasito se move para dentro da célula enquanto a membrana hospedeira passa a envolver o parasito, que torna-se intracelular, completamente envolto pela estrutura agora formada chamada vacúolo parasitóforo. Uma intensa secreção protéica é observada dentro do vacúolo gerando uma modificação de composição interna e de sua membrana. O processo de multiplicação por endodiogenia toma lugar após algumas horas de infecção e continua de forma devastadora com a formação de um psedocisto, com centenas de taquizoítos. Por fim, ocorre a lise da célula hospedeira e a liberação dos novos taquizoítos que irão invadir outras células vizinhas (HEMPHILL, 1999; BUXTON *et al.*, 2002).

Experimentos *in vitro* demonstram que o vacúolo parasitóforo contendo o parasito não é fundido com organelas lisossomais da célula hospedeira. Isso é decorrente do processo ativo de penetração celular e da secreção de substâncias inibitórias pelas roptrias e grânulos densos do parasito, caracterizando assim uma estratégia de sobrevivência do mesmo (HEMPHILL, 1999).

A interface materno-fetal no útero grávido de bovinos é composta por mais de 100 placentomas que compõe uma estrutura formada da íntima união da carúncula materna e cotilédone fetal. A imunomodulação materna promove o desenvolvimento fetal sem que ocorra rejeição do mesmo, todavia essa regulação imunológica também favorece a invasão de *N. caninum* nas células do útero bovino. Sua multiplicação leva a necrose, inflamação e destruição do tecido materno e fetal, além de disseminação do parasito nas vilosidades placentárias, sendo que a amplitude de destruição nesse tecido depende da idade do feto, variando de extensa lesão a focos restritos de necrose com intensa resposta inflamatória. Além disso, o protozoário atinge a circulação sanguínea e invade outros tecidos, tendo predileção pelo SNC (BUXTON *et al.*, 1998; BUXTON *et al.*, 2002; MALEY *et al.*, 2003; MACALDOWIE *et al.*, 2004; DUBEY *et al.*, 2006).

Pouco se sabe a respeito da replicação sexuada de *N. caninum*, ou seja, sobre os possíveis estágios intestinais que antecedem a formação dos oocistos nos hospedeiros definitivos. Além disso, não há estudos sobre a penetração de esporozoítos de *N. caninum* em cultura celular, apesar de ser possível isolar taquizoítos *in vitro* a partir de oocistos (GONDIM *et al.*, 2002). Estudos com *T. gondii* revelaram que quando o hospedeiro definitivo ingere cistos deste parasito, os mesmos são digeridos por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal. Bradizoítos são liberados, penetram a lâmina própria, se multiplicam na forma de taquizoítos, e dentro de poucas horas, o parasito se dissemina nos tecidos extra-intestinais. Outros bradizoítos invadem as células epiteliais intestinais e se diferenciam em várias gerações de esquizontes e posteriormente em merozoítos, que vão formar os gametas da reprodução sexuada. Microgametócitos (gametas masculinos) possuem flagelos e são lançados no lúmen intestinal para fertilizar os macrogametócitos (gametas femininos) localizados dentro das células epiteliais. Desta forma é gerado o zigoto, que recebe uma membrana e passa a formar os oocistos, que são lançados na luz intestinal ainda imaturos (DUBEY, 2004).

Inoculações experimentais de oocistos esporulados de *T. gondii* em camundongos demonstram que após a ingestão, esporozoítos são excistados, penetram nos enterócitos e são vistos no epitélio intestinal dentro de 30 minutos após a inoculação. Em seguida, são carregados para a lâmina própria, sendo que alguns podem ser encontrados na circulação periférica na forma de taquizoíto após quatro horas de ingestão. Todavia, a maior parte permanece na lâmina própria onde há multiplicação parasitária em vários tipos celulares e posterior disseminação em outros órgãos. São observados edema, necrose da lâmina própria e

enterite (DUBEY, 1998a, 2004). A invasão dos esporozoítos nos enterócitos, diferente dos taquizoítos, forma um primeiro vacúolo parasitóforo de grande extensão, o qual desaparece após 24 horas e os parasitos são vistos então em pequenos vacúolos (SPEER *et al.*, 1995; TILLEY *et al.*, 1997).

## **2.6 Aspectos imunológicos envolvidos na patogênese da neosporose**

O conhecimento dos aspectos imunológicos envolvidos na infecção dos animais pelo parasito *N. caninum* é importante para permitir o entendimento da patogênese da neosporose e assim estabelecer estratégias de controle da mesma (ANDERSON *et al.*, 2000).

Como outros protozoários apicomplexas, *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório (HEMPHILL, 1999), assim a resposta mediada por células é fundamental para a imunidade do hospedeiro.

O sistema imunológico de bovinos se desenvolve de forma progressiva durante a gestação (BARRINGTON e PARISH, 2001; INNES *et al.*, 2005). No primeiro trimestre, o feto é vulnerável a infecções por microorganismos, uma vez que órgãos linfóides com o timo, baço e linfonodos ainda estão sendo formados. No segundo trimestre, o feto torna-se capaz de montar uma resposta imunológica à vários patógenos (INNES *et al.*, 2005).

Assim, quando a infecção por *N. caninum* ocorre no primeiro trimestre de gestação e o parasito atinge o feto, normalmente não há sobrevivência fetal. No segundo terço, uma resposta rudimentar começa a ser estabelecida, apesar de não ser suficiente para protegê-lo, uma vez que a maioria dos abortos acontece nesse período (ANDERSON *et al.*, 2000). Quando a infecção ocorre no último terço de gestação geralmente o feto sobrevive, entretanto, pode nascer infectado e apresentar-se clinicamente sadio (DUBEY e LINDSAY, 1996; BUXTON *et al.*, 2002).

Estudos de infecções experimentais com taquizoítos de *N. caninum* revelam que o feto é mais vulnerável no primeiro terço de gestação e que a maioria das vacas infectadas nesse período transmite a infecção para o feto, o que geralmente é fatal (WILLIAMS *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2003; MACALDOWIE *et al.*, 2004). Já os animais infectados no último

terço de gestação geram, em sua maioria, bezerros infectados, porém clinicamente saudáveis (WILLIAMS *et al.*, 2000). Por outro lado, a frequência de infecção transplacentária no início da gestação em animais infectados com oocistos do parasito foi nula ou baixa (TREES *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2004b).

Nas vacas em gestação, a resposta celular do tipo Th-1 com produção de Interleucina 12 (IL-12), Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) é efetiva contra *N. caninum*, mas pode interferir na sobrevivência do feto (ENTRICAN, 2002; INNES *et al.*, 2002; QUINN *et al.*, 2002). Por outro lado, a produção de progesterona por essas vacas estimula a conversão da resposta Th1 para a resposta celular do tipo Th-2, com aumento nos níveis de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, apesar de favorável ao desenvolvimento fetal, é pouco efetiva no controle da infecção (ENTRICAN, 2002; QUINN *et al.*, 2002; INNES *et al.*, 2005).

Quando a infecção por *N. caninum* ocorre no primeiro terço de gestação, há um baixo risco de transmissão transplacentária, pois a resposta imune da vaca é predominantemente do tipo Th1, a qual é geralmente efetiva contra organismos intracelulares. Com o progresso da gestação, há um aumento na produção de progesterona, o que contribui para a mudança de uma resposta Th1 para Th2. Nessa fase de transição, acredita-se que o feto seja mais susceptível à infecção e ao abortamento, pois seu sistema imune ainda está pouco desenvolvido. No terceiro trimestre de gestação, o risco de abortamento é baixo devido ao desenvolvimento do sistema imune fetal, mas o risco de transmissão transplacentária do parasito é maior devido o estabelecimento da resposta Th2 (WILLIAMS *et al.*, 2000; QUINN *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2003; MACALDOWIE *et al.*, 2004).

Apesar do título de anticorpos anti-*N. caninum* funcionar como importante ferramenta diagnóstica, pouco se sabe a respeito da eficácia dos anticorpos contra o parasito, entretanto um provável papel é o de dificultar a entrada dos taquizoítos nas células hospedeiras (INNES *et al.*, 2002).

## 2.7 Aspectos epidemiológicos da neosporose

A neosporose apresenta distribuição mundial e tem sido diagnosticada em todos os continentes (ANDERSON *et al.*, 2000, DUBEY *et al.*, 2007). No Brasil há relatos de isolamento de cepas do parasito a partir de bezerro, búfalo e cão infectados, estudos que confirmam a infecção de animais pelo protozoário e de ocorrência de anticorpos contra o parasito em todas as regiões do país (DUBEY *et al.*; 2007).

A infecção por *N. caninum* tem se destacado como importante causa de abortamentos em bovinos, contudo há poucos dados a respeito das perdas econômicas devido a neosporose (DUBEY, 2003). Estima-se que cerca de 20 a 43% dos abortos bovinos do Estado da Califórnia ocorrem em função da neosporose e geram perdas na ordem de 35 milhões de dólares por ano (ANDERSON *et al.*, 1991).

Em bovinos, são observados padrões de abortos que podem ser epidêmico, endêmico ou esporádico. Os abortos epidêmicos estão relacionados com a ocorrência de altas taxas de aborto em curto período de tempo, com mais de 30% de vacas abortando. Abortos endêmicos ocorrem em propriedades com animais cronicamente infectados, cuja frequência de abortamentos é superior a 5%. Abortos esporádicos caracterizam-se por baixos percentuais de abortamentos (ANDERSON *et al.*, 2000).

## 2.8 Sinais Clínicos

Nos hospedeiros intermediários, o único sinal clínico observado é o aborto, que nos bovinos adultos, tem sido relatado a partir dos três meses de gestação. Pode ocorrer reabsorção, autólise ou mumificação fetal no útero; são também observados natimortos, nascimento de animais vivos, mas doentes, ou clinicamente saudáveis e cronicamente infectados (DUBEY e LINDSAY, 1996; ANDERSON *et al.*, 2000; INNES *et al.*, 2005).

Cães jovens e congenitamente infectados podem desenvolver paresia dos membros posteriores que geralmente evolui para uma paralisia progressiva (CUDDON *et al.*, 1992; DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003). O tipo de alteração neurológica depende da área do sistema nervoso central lesada. Os membros posteriores são geralmente mais afetados

que os anteriores e há a possibilidade de ocorrer outras disfunções como paralisia mandibular, dificuldade de deglutição, flacidez e atrofia muscular, e até mesmo falha cardíaca (BUXTON *et al.*, 2002; DUBEY, 2003).

Bezerros podem também apresentar sinais neurológicos, incapacidade de crescimento, permanecer abaixo do peso ou até mesmo não apresentar nenhum sinal clínico (DUBEY, 2003).

A neosporose tem sido detectada em outras espécies de animais domésticos e silvestres, porém a casuística observada não tem sido tão freqüente quanto relatado em bovinos. Contudo, os sinais observados são semelhantes aqueles encontrados na espécie bovina (HEMPHILL, 1999).

## **2.9 Diagnóstico**

Diferentes técnicas diagnósticas têm sido empregadas no estudo da neosporose, a exemplo de testes sorológicos, histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares. A detecção de anticorpos específicos para *N. caninum* é uma importante ferramenta para avaliar a exposição dos animais ao protozoário e verificar possíveis riscos de ocorrência da doença (HEMPHILL, 1999), enquanto que a identificação de lesões típicas presentes nos tecidos do hospedeiro é fundamental para o diagnóstico conclusivo de neosporose (DUBEY e SCHARES, 2006).

### **2.9.1 Diagnóstico sorológico**

A produção de anticorpos específicos contra as proteínas imunogênicas de *N. caninum* pelos animais infectados é o alvo dos métodos sorológicos. Assim, o desenvolvimento desses testes requer o isolamento do organismo infeccioso para produção de antígeno e padronização destas técnicas. A sorologia tem como vantagens a utilização *ante mortem* ou *post mortem*, a determinação da soropositividade nos rebanhos, além de possibilitar a diferenciação entre infecções agudas e crônicas (INNES *et al.*, 2005; DUBEY e SCHARES, 2006).



A primeira técnica para a detecção de anticorpos IgG anti-*N.caninum* foi a imunofluorescência indireta (IFI), (DUBEY *et al.*, 1988b) a qual é considerada padrão ouro para diagnóstico do protozoário (BJORKMAN e UGGLA, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000).

Em alguns casos, a detecção de anticorpos é o único meio de demonstrar a infecção nos animais. Isto foi relatado por Schares *et al.* (2001a) quando infectaram animais com oocistos de *N. caninum* e não determinaram o estabelecimento da infecção por histopatologia ou PCR, apenas por meios sorológicos.

Em parasitos apicomplexas, certos antígenos de superfície apresentam elevada imunogenicidade. A utilização de taquizoítos intactos, assim como a pequena possibilidade de reações cruzadas, fazem com que a IFI se destaque como técnica de eleição para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (BJORKMAN e UGGLA, 1999). Desde a sua padronização (DUBEY *et al.*, 1988b), muitos estudos epidemiológicos vêm utilizando essa técnica (DUBEY *et al.*, 1988b; BARR *et al.*, 1995; PARE *et al.*, 1995; REICHEL e DRAKE, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997; CANON-FRANCO *et al.*, 2004; FIGLIUOLO *et al.*, 2004; GONDIM *et al.*, 2004b; GUIMARAES *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004a; RODRIGUES *et al.*, 2004; VITALIANO *et al.*, 2004; GENNARI *et al.*, 2005; CORBELLINI *et al.*, 2006b; McINNIS *et al.*, 2006a; BRESCIANI *et al.*, 2007; HECKEROTH e TENTER, 2007).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são também empregados no diagnóstico da infecção por *N.caninum*. Ao contrario da IFI, há vários tipos de ensaios utilizando antígeno bruto do protozoário, taquizoítos inteiros, proteínas purificadas ou até mesmo proteínas recombinantes (BJORKMAN *et al.*, 1994; DUBEY e SCHARES, 2006).

Desde a elaboração do primeiro teste ELISA para *N. caninum* (BJORKMAN *et al.*, 1994), há vários relatos de utilização da técnica para detecção de anticorpos específicos contra o parasito (BJORKMAN *et al.*, 1994; REICHEL e DRAKE, 1996; O'HANDLEY *et al.*, 2002; SAGER *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2007).

Na técnica de imunoblotting há a detecção de anticorpos específicos para as proteínas de membrana dos parasitos que iniciam o processo de interação entre o patógeno e a célula hospedeira. As proteínas de 29 kDa (NcSAG1) e 35 kDa (NcSRS2) são os antígenos

principais predominantemente reconhecidos por anticorpos de animais infectados por *N. caninum* (BJERKAS *et al.*, 1994; HOWE *et al.*, 1998; HOWE e SIBLEY, 1999)

### **2.9.2 Diagnóstico Histopatológico e Imuno-histoquímico.**

O exame histopatológico é de fundamental importância para a determinação do diagnóstico de neosporose. O principal quadro encontrado é de encefalite focal caracterizada por inflamação não supurativa, podendo estar associada à presença de cistos ou grupos de prozoários nos focos necróticos distribuídos nos tecidos (THILSTED e DUBEY, 1989; DUBEY e PORTERFIELD, 1990; DUBEY *et al.*, 1992a; SAWADA *et al.*, 1997; PETERS *et al.*, 2001a; DUBEY 2003; SOLDATI *et al.*, 2004; LEMBERGER *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2006).

Na neosporose aguda, experimentalmente induzida em camundongos, constata-se lesões características, especialmente encontradas no SNC e na medula espinhal, como meningite linfocítica, gliose e encefalite necrótica multifocal (THILSTED e DUBEY, 1989; BUXTON *et al.*, 2002). Todavia, alterações inflamatórias ocorrem em outros tecidos como músculo cardíaco, esquelético, fígado, pulmão (THILSTED e DUBEY, 1989; SAWADA *et al.*, 1997; BASSO *et al.*, 2001; CORBELLINI *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2001a; BUXTON *et al.*, 2002; CORBELLINI *et al.*, 2006a; DUBEY *et al.*, 2006) e útero, onde as lesões placentárias, geralmente confinadas nos cotilédones, consistem de áreas necróticas com inflamação não-supurativa nos quais se encontram taquizoítos (DUBEY *et al.*, 2006).

Em alguns casos, em função da pequena quantidade de parasitos observados em cortes teciduais corados com hematoxilina e eosina (H&E), torna-se necessário a realização da técnica de imuno-histoquímica em tecidos que apresentam lesões, utilizando-se anticorpos anti-*N. caninum* (DUBEY, 2003).

O diagnóstico por meio da imuno-histoquímica é considerado mais confiável que apenas a avaliação por coloração com H&E, e desde sua primeira utilização para o diagnóstico de neosporose por Lindsay e Dubey (1989), tem sido amplamente utilizada para identificar animais com infecção por *N. caninum* (LINDSAY e DUBEY, 1989; SOLDATI *et al.*, 2004; LEMBERGER *et al.*, 2005; CORBELLINI *et al.*, 2006a)

### **2.9.3 Diagnóstico molecular**

As técnicas de biologia molecular têm sido largamente utilizadas para detectar fragmentos de DNA de *N. caninum* em amostras de tecidos (YAMAGE *et al.*, 1996; ELLIS *et al.*, 1999a; LIDDELL *et al.*, 1999; O'HANDLEY *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004b; SOLDATI *et al.*, 2004; LEMBERGER *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2005; HURKOVA e MODRY, 2006; McINNES *et al.*, 2006b) por sua alta sensibilidade e especificidade (ANDERSON *et al.*, 2000).

O uso dos primers NP-6 e NP-21 na PCR possibilita detectar material genético de um único taquizoítio e não demonstrou reação cruzada com outros coccídeos como *T. gondii*, *Sarcocystis spp* e *Hammondia hammondi* (YAMAGE *et al.*, 1996).

A sensibilidade e especificidade diagnósticas da PCR são influenciadas por alguns fatores importantes como o DNA alvo apropriado, pares de primers específicos, protocolos adequados, métodos de extração, purificação e armazenamento de DNA molde, e uso de reagentes e equipamentos apropriados (DUBEY e SCHARES, 2006).

Apesar de sua sensibilidade, é importante frisar que apenas os resultados da PCR não são suficientes para determinar a neosporose no animal, sendo necessário também a identificação de lesões características e detecção do parasito associado às lesões (DUBEY e SCHARES, 2006).

## **2.10 Caracterização dos oocistos de *N. caninum***

### **2.10.1 Aspectos morfológicos**

Como mencionado anteriormente, os oocistos de *N. caninum* são formados no intestino e excretado nas fezes de cães e coiotes, únicas espécies animais identificadas até o momento como hospedeiros definitivos (McALLISTER *et al.*, 1998a; GONDIM *et al.*, 2004c).

Morfologicamente, os oocistos são esféricos, e quando excretados pelo hospedeiro definitivo, só há o zigoto que, no ambiente, em condições adequadas de temperatura e umidade, esporula

em média a partir de 24 horas, desenvolvendo dois esporocistos com os esporozoítos infectantes (LINDSAY *et al.*, 1999b; BELLI *et al.*, 2006).

Há poucos estudos envolvendo oocistos de *N. caninum*, portanto, parte do ciclo de vida do protozoário ainda é desconhecido. Por exemplo, não se sabe acerca da formação dos estágios entero-epiteliais precedentes à formação dos oocistos e se a produção dos mesmos pode ser iniciada nos cães após ingestão de oocistos esporulados (McALLISTER *et al.*, 1998a; DUBEY *et al.*, 2002a).

### **2.10.2 Diferenciação de outros coccídeos**

Antes do isolamento e classificação de *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988a; DUBEY *et al.*, 1988b) havia muitos relatos inconclusivos de infecção por *T. gondii* em cães que apresentavam comprometimento do SNC (KOESTNER e COLE, 1960; BJERKAS *et al.*, 1984). Contudo, com a caracterização do protozoário, foi demonstrado que *N. caninum* e *T. gondii* são distintos morfológicamente e antígenicamente (DUBEY e LINDSAY, 1996; ELLIS *et al.*, 1999b).

Oocistos esporulados de *N. caninum* são morfológicamente similares aos oocistos de *H. heydorni* encontrados em fezes de cães, semelhantemente ao que ocorre com oocistos de *T. gondii* e *H. hammondi* em fezes de gatos (DUBEY, 1999; McALLISTER, 1999).

Essa semelhança pode ocasionar equívocos no diagnóstico conforme demonstrado por Schares *et al.* (2001b), que verificaram por imunoblotting e PCR que oocistos de *H. heydorni* da cepa Berlin, isolada no ano de 1996, eram na realidade oocistos de *N. caninum*. Essa descoberta evidenciou que oocistos desses dois protozoários podem ser confundidos e que muitos resultados de estudos prévios relatando a excreção de *H. heydorni* nas fezes de cães, baseados apenas na morfologia dos oocistos, sem a confirmação por testes mais específicos, podem estar incorretos. Desta forma, é importante avaliar criticamente os trabalhos envolvendo oocistos de *H. heydorni*, uma vez que não há completa certeza se os mesmos equivalem a oocistos de *H. heydorni*, *N. caninum* ou até mesmo de outro protozoário que tenha o cão como hospedeiro final (SCHARES *et al.*, 2001b).

*N. caninum* é filogeneticamente mais próximo de *H. heydorni*, contudo, pouco se sabe a respeito da antigenicidade do protozoário *H. heydorni* e da possibilidade de reações cruzadas com outros protozoários apicomplexas nos testes sorológicos, uma vez que ainda não houve isolamento do parasito em cultivo celular e, portanto, não há testes sorológicos disponíveis (SCHARES *et al.*, 2001b).

### 2.10.3 Resistência no ambiente

A parede do oocisto dos coccídeos desempenha um papel fundamental na sobrevivência do parasito no ambiente, já que sua resistência a danos mecânicos e impermeabilidade a determinadas soluções como hipoclorito de sódio, dicromato de potássio, ácido sulfúrico a 2% permitam a sobrevivência de coccídeos. Porém, são sensíveis a altas temperaturas e pouca umidade (DUBEY, 1998b; DUMETRE e DARDÉ, 2003; BELLI e FERGUSON, 2006).

Atualmente, pouco se sabe sobre a biologia do oocisto de *N. caninum*, a frequência de excreção pelos hospedeiros definitivos, longevidade e infectividade dos oocistos no ambiente (DUBEY, 2003). Por esses motivos, muitas informações são inferidas em função dos trabalhos realizados com *T. gondii*.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da variação de temperatura de – 10°C a 70°C, na infectividade de oocistos esporulados de *T. gondii*, os mesmos foram inoculados experimentalmente em camundongos e foi observado que oocistos estocados a 10, 15, 20 e 25°C permaneceram infectantes por 200 dias. Quando submetidos à temperatura de 35°C, permaneceram viáveis por 32 dias, à 40°C por nove dias, à 45°C por um dia, e à 50°C por uma hora. Oocistos estocados por 54 meses em água sem nenhum preservativo, à 4°C permaneceram viáveis. Além disso, não foi observada perda de infectividade em oocistos estocados à – 5°C e – 10°C por 106 dias e à 0°C por 13 meses, demonstrando a grande resistência de oocistos de *T. gondii* a variações térmicas (DUBEY, 1998b)

Em outros estudos, verificou-se que oocistos de *T. gondii* submetidos a condições de congelamento por um dia a – 21°C ou a – 6°C por sete dias ou ainda à 50°C por dez minutos perdem a capacidade de esporular (DUBEY *et al.*, 1970; FRENKEL e DUBEY, 1973). A exposição de oocistos não esporulados a temperatura de 37°C por 24 horas provocou sua

destruição, entretanto, permanecem viáveis quando submetidos às temperaturas de 25°C por 24 horas, 15°C por cinco dias e 11°C por 21 dias (DUBEY *et al.*, 1970).

Oocistos de *T. gondii* são capazes de permanecer viáveis no ambiente por um ano, além disso, podem ser disseminados no ambiente pelo vento, água, por parasitos e artrópodes, e desta forma, podem contaminar água e alimento disponíveis para os hospedeiros intermediários (FRENKEL *et al.*, 1975; DUMETRE e DARDÉ, 2003).

Diferentes condições de temperatura e umidade influenciam diretamente na sobrevivência do oocisto, seja ele mantido em água ou em material fecal. A duração da infectividade de oocistos de *T. gondii* à 37°C, sem umidade adequada e dentro do material fecal, foi de 30 dias, enquanto oocistos em água permaneceram viáveis por 91 dias. Acredita-se que o processo de decomposição das fezes produz condições letais para os oocistos (YILMAZ e HOPKINS, 1972).

Os oocistos não esporulados de *T. gondii* sob condições de refrigeração por até 11 semanas, podem perder sua capacidade de esporular, entretanto, aqueles que permanecem viáveis, esporulam e são infectantes para o animal (LINDSAY *et al.*, 2002).

#### **2.10.4 Frequência e quantidade excretada**

O primeiro relato de isolamento de oocistos de *N. caninum* a partir das fezes de um cão naturalmente infectado por este protozoário foi descrito por Basso *et al.* (2001). Estes autores mencionaram que o número de parasitos excretados, provavelmente, foi pequeno, porém os oocistos não foram quantificados. Adicionalmente, Slapeta *et al.* (2002) descreveram o isolamento de oocistos de *N. caninum* das fezes de um cão, onde recuperaram 10<sup>6</sup> oocistos por meio da técnica de flutuação em açúcar. Mais tarde, McGarry *et al.* (2003) também identificaram um cão naturalmente infectado que eliminou 378 oocistos por grama de fezes, os quais foram positivos para *N. caninum* pela PCR.

O número de oocistos de *N. caninum* excretado nas fezes de canídeos pode ser tão pequena que se torna indetectável (BASSO *et al.*, 2001) e, em infecções experimentais, depende do número de cistos teciduais que são consumidos e pelo tipo e quantidade de alimento utilizado

para infecção (McALLISTER, 1999). Gondim *et al.* (2002) alimentaram nove cães com tecidos de bezerros infectados com taquizoítos ou oocistos de *N. caninum* e observaram que estes animais excretavam mais oocistos que aqueles cães alimentados com carcaças de camundongos infectados com o protozoário. Especula-se que o baixo número de oocistos produzido em experimentos é devido ao baixo número de bradizoítos nas carcaças dos camundongos infectados experimentalmente (McALLISTER *et al.*, 1998b; LINDSAY *et al.*, 1999a).

Com relação à possibilidade de re-excreção, McGarry *et al.* (2003) identificaram um cão que eliminou oocistos de *N. caninum* testados pela PCR e que após quatro meses re-excretou oocistos do parasito. Porém, estes autores não puderam confirmar se o cão foi re-exposto a tecidos infectados, ou se apresentou uma re-excreção tardia de oocistos. Gondim *et al.* (2005) relataram a re-excreção de oocistos de *N. caninum* por dois cães re-expostos a tecidos de bezerros infectados com o parasito após 18 a 20 meses do primeiro desafio, demonstrando que a imunidade contra o parasito desenvolvida na primo-infecção pode não persistir por muito tempo, levando o animal a re-excretar oocistos do protozoário.

### 2.11 Bioensaio em animais de laboratório

Dentre os animais de laboratório, o gerbil (*Meriones unguiculatus*) (Figura 5) se destaca como modelo experimental para estudo da neosporose (CUDDON *et al.*, 1992; GONDIM *et al.*, 1999a; DUBEY e LINDSAY, 2000).



Figura 5. Gerbil (*Meriones unguiculatus*).

O gerbil é o mais comum dos roedores da família *Gerbillinae* e há poucas informações de sua história natural e distribuição geográfica, embora seja habitante de áreas desérticas da China e Mongólia (BURKE, 1979).

Suas características físicas e susceptibilidade a determinadas doenças favorecem sua utilização como modelo experimental em vários estudos sobre a toxoplasmose (SUZUKI e TSUNEMATSU, 1974; FUJII *et al.*, 1983), criptosporidiose (BAISHANBO *et al.*, 2005; KVIC *et al.*, 2007) e leptospirose (YUKAWA *et al.*, 1990; YUKAWA, 1991).

Com relação à neosporose, a infecção de gerbil com taquizoítos de *N. caninum* por passagens intraperitoneais foi realizada com sucesso por Gondim *et al.* (1999a). Em 2001, a primeira cepa brasileira de *N. caninum* (NC-Bahia) foi isolada após inoculação de tecido nervoso oriundo de um cão em Gerbis (GONDIM *et al.*, 2001).

A susceptibilidade à infecção por taquizoítos da cepa Nh-A1 de *Neospora hughesi* foi testada em gerbis e apesar deles não terem desenvolvidos sinais clínicos da doença, ocorreram soroconversões e algumas lesões microscópicas foram detectadas (WALSH *et al.*, 2000).

Inoculações orais com 1000 oocistos de *N. caninum* foram efetuadas em gerbis e foi verificada a presença de lesões em tecidos dos roedores. Em infecções com 10 e 100 oocistos, além de lesões características no cérebro foram encontrados títulos de anticorpos maiores que 1:500 na técnica de aglutinação (DUBEY e LINDSAY, 2000).

De 11 gerbis inoculados com doses de 100 a 3300 oocistos de *N. caninum* foi detectado DNA do parasito em dois animais, apesar de não apresentarem sinais clínicos de doença, demonstrando que este roedor pode ser mais susceptível ao protozoário que outros hospedeiros intermediários (SCHARES *et al.*, 2001b).

Basso *et al.* (2001) também verificaram a infectividade de oocistos de *N. caninum* detectados nas fezes de um cão naturalmente infectado pelo protozoário realizando inoculações orais em gerbis, os quais apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* e cistos do parasito foram encontrados no tecido nervoso.



Schares *et al.* (2002) demonstraram a susceptibilidade de gerbis à inoculação com quantidades pequenas de oocistos de *N. caninum* produzidos em cães e verificaram que apenas cinco oocistos esporulados do parasito são capazes de produzir uma resposta de anticorpos do hospedeiro contra os antígenos imunodominantes do parasito.

Camundongos imunocompetentes normalmente não desenvolvem neosporose. *N. caninum* é infectivo para linhagens de camundongos imunodeficientes ou camundongos tratados com corticoesteroides, os quais são úteis como modelos biológicos. Contudo, o desenvolvimento da neosporose clínica nesses animais depende ainda da cepa e quantidade de parasitos inoculados (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Outras espécies de roedores como o “rato de areia” *Psammomys obesus*, “Tristram’s jirds” *Meriones tristami*, “Multimammate rat” (*Mastomys natalensis*), “Wagner’s gerbil” (*Gerbillus dasyurus*) foram testadas e mostraram-se susceptíveis à neosporose (PIPANO *et al.*, 2002; HURKOVA-HOFMANNOVA *et al.*, 2007).

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Loss of infectivity of 46 month old *Neospora caninum* oocysts

R.S. Uzeda<sup>a</sup>, K.S. Costa<sup>a</sup>, S.L. Santos<sup>a</sup>, A.M. Pinheiro<sup>a</sup>, M.A.O. Almeida<sup>a</sup>, M.M. McAllister<sup>b</sup>,  
L.F.P. Gondim<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup> Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Avenida Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brazil 40170-110

<sup>b</sup> University of Illinois, Department of Veterinary Pathobiology, 2001 South Lincoln Avenue, Urbana, IL, USA 61802

\* Corresponding author (L.F.P. Gondim): Tel: 55 71 3263-6735 Fax: 55-71 3263-6730

E-mail: pita@ufba.br

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate whether sporulated *Neospora caninum* oocysts, which had been stored for 46 months in a 2% sulfuric acid solution at 4°C, remain morphologically viable and infective to gerbils (*Meriones unguiculatus*). Six gerbils were orally inoculated with doses of 400 or 1,200 oocysts. Two months after inoculation, the animals did not show any clinical signs, had no histological lesions, and were seronegative for *N. caninum* at 1:50 in an immunofluorescent antibody test. PCR using brain from each gerbil did not reveal *N. caninum* specific DNA. We conclude that oocysts preserved for 46 months are not infective, despite being morphologically intact.

Keywords: *Neospora caninum*; Oocysts; Mongolian gerbils; *Meriones unguiculatus*; Infectivity

## 1. Introduction

*Neospora caninum* is a protozoan parasite that infects a wide range of domestic (DUBEY and LINDSAY, 1996) and wild animals (GONDIM, 2006). Neosporosis is the most important cause of abortion in cattle in many geographic regions (ANDERSON *et al.*, 2000) and is responsible for neuropathy in dogs (BARBER e TREES, 1996). Intermediate hosts of *N. caninum* can be infected transplacentally from dam to fetus (DUBEY, 2003) or horizontally by ingestion of oocysts shed by a definitive host, such as dogs or coyotes (McALLISTER *et al.*, 1998a; GONDIM *et al.*, 2004c).

Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) have been shown to be susceptible to *N. caninum* infection. The parasite was successfully isolated from dogs through peritoneal inoculation of *N. caninum*-infected dog tissues in gerbils; isolation failed when the same tissues were inoculated in mice, guinea pigs, hamsters and rabbits (CUDDON *et al.*, 1992). Several passages of *N. caninum* tachyzoites were achieved through peritoneal inoculations of the parasite in gerbils (GONDIM *et al.*, 1999a). Gerbils were also demonstrated to be susceptible to oral inoculation with *N. caninum* oocysts (DUBEY and LINDSAY, 2000; BASSO *et al.*, 2001; GONDIM *et al.*, 2001); this rodent species can be infected by a single oocyst (TREES *et al.*, 2002).

The purpose of this study was to investigate if *N. caninum* oocysts remain infective to gerbils after prolonged storage at 4°C in an acidified solution.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Parasite oocysts

*Neospora caninum* oocysts (NC-beef strain) were produced in a previous experiment (GONDIM *et al.*, 2002), and infected feces containing oocysts were homogenized and suspended in 2% sulfuric acid at 4°C, without purification of oocysts.

In July 2004, a total of 30,000 sporulated *N. caninum* oocysts were purified by flotation in Sheather's solution, counted, divided in four 2mL-plastic tubes in 2% sulfuric acid solution, and stored at 4°C. In June 2005, oocysts were washed four times with sterile phosphate buffer solution (PBS) to remove the sulfuric acid, and recounted. Oocysts (46 months old) were resuspended in sterile PBS and distributed in six tubes of 1mL each. Three tubes contained 400 oocysts each, and the other three tubes contained 1,200 oocysts each.

## 2.2 Experimental inoculations and examination of animals

Fourteen female Mongolian gerbils, 8-12 weeks old, were purchased from Universidade Federal da Bahia. Six gerbils were orally inoculated with *N. caninum* oocysts using an esophageal canula. An additional six uninoculated gerbils served as negative controls. All animals were anaesthetized in a plastic chamber with isoflurine before oral inoculation. In the test group, three animals were administered 400 oocysts each, and three gerbils received 1,200 oocysts each. The negative control gerbils were orally administered 1mL of PBS each. After oral inoculation, animals were observed daily for clinical signs. Two months after inoculations all animals were killed. Samples of blood and brain were collected from each gerbil. Three-fourths of the brain was used for DNA extraction and one fourth was fixed in 10% neutral buffered formalin.

A group of three gerbils and three pregnant cows that had been previously inoculated with oocysts (stored in 2% sulfuric acid at 4°C up to 108 days) (GONDIM *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2004b) produced by the same dogs that originated the oocysts for the current experiment were considered as positive controls. The three gerbils were orally inoculated with 30 oocysts each, and infection was confirmed in the three animals by serology and PCR (GONDIM *et al.*, 2002). The three pregnant cows received 1,500 oocysts each, and two of three cows became infected (GONDIM *et al.*, 2004b).

Two gerbils were subcutaneously inoculated with 7,500 *N. caninum* tachyzoites in 0.5ml of PBS each in order to produce positive control tissues for PCR and positive sera for serology. One gerbil was killed nine days after infection, and the other animal was killed 30 days after infection.

### 2.3 Serology

Pre and post inoculation sera were tested for *N. caninum* antibody using an indirect fluorescent antibody test (IFAT), as described by (DUBEY *et al.*, 1988b) with minor modifications. A 1:50 cut-off dilution was employed and a commercial fluorescein isothiocyanate labeled anti-mouse IgG was used as secondary antibody (Sigma, St. Louis, MO). IFAT reactions were only considered positive if the whole tachyzoite surface was fluorescent.

Pre and post-infection sera were obtained from two gerbils which had been subcutaneously infected with *N. caninum* tachyzoites, and used as negative and positive controls. Serology and PCR (described below) evaluations were performed in positive controls to demonstrate that all techniques functioned properly.

### 2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Three-fourth of total brain was homogenized with a pestle and mortar in liquid nitrogen. DNA extraction was performed using an Easy-DNA™ kit (Invitrogen, São Paulo, SP). DNA from *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites of NC-Bahia and RH strains were used as positive controls and ultra-pure water as negative control. A 100 bp DNA ladder (Invitrogen, São Paulo, SP) was used as a marker.

PCR reactions were performed in 25µl volumes containing the NP6/NP21 primer pair (YAMAGE *et al.*, 1996), a PCR Master Mix (Promega, Madison, WI), and the template. Reaction conditions were 1 cycle at 94°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 30 sec, 53°C for 30 sec, 72°C for 30 sec; and a final 72°C for 5 min. A reamplification of the PCR products was done using the same conditions. PCR for *T. gondii* was performed similarly, except by using the primer pair TgB1-1 and TgB1-4 (BURG *et al.*, 1989) and an annealing temperature of 55°C. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

## 2.5 Histopathology

One-fourth of each gerbil brain that was fixed in 10% neutral buffered formalin was processed for histological examination and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Nine stained sections from each gerbil were analyzed for lesions or parasite stages.

## 3. Results

Sporulated *N. caninum* oocysts which had been storage for 46 months were orally inoculated in six gerbils. The animals did not show any clinical signs, had no histological brain lesions, and did not have specific antibodies at a 1:50 cutoff by IFAT. PCR using brain from each gerbil did not reveal *N. caninum* specific DNA. In contrast, results of IFAT (titers of 1:400 and 1:6,400) and PCR were positive in the gerbils that had been inoculated with *N. caninum* tachyzoites, demonstrating that the procedures were sensitive enough to detect infection of gerbils. The six gerbils used as negative controls did not present any clinical signs or lesions and were negative for *N. caninum* infection by IFAT and PCR.

Gerbils were inoculated with 400 or 1,200 morphologically intact oocysts each. Oocysts in storage were counted on two occasions, immediately before inoculation and one year earlier. The number of sporulated *N. caninum* oocysts observed dropped from 30,000 to 4,800 during this interval.

## 4. Discussion

Horizontal transmission of *N. caninum* by ingestion of parasite oocysts is associated with abortion outbreaks in cattle (McALLISTER *et al.*, 1996; JENKINS *et al.*, 2000; McALLISTER *et al.*, 2000) and has been demonstrated to be necessary to sustain *N. caninum* infection in bovine herds (McALLISTER 1999). After dogs were identified as definitive hosts of *N. caninum* (McALLISTER *et al.*, 1998a) several studies involving experimental infection with oocysts have been done (DE MAREZ *et al.*, 1999; DUBEY e LINDSAY 2000;

O'HANDLEY *et al.*, 2002; TREES *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2004a; GONDIM *et al.*, 2004b; RODRIGUES *et al.*, 2004) however the biology of *N. caninum* oocysts remains poorly understood. Before the present experiment, there was no information regarding infectivity of *N. caninum* oocysts maintained for prolonged time. Similar protozoal oocysts, such as those of *Toxoplasma gondii*, are infective for several years in 2% sulfuric acid at 4°C (reviewed by DUMETRE and DARDÉ, 2003).

In the present study, *N. caninum* oocysts, which had been stored for 46 months in 2% sulfuric acid solution at 4°C, were orally inoculated in gerbils. The oocysts were first counted when they were two years old, and then recounted when they were nearly 4 years old; during this interval, the number of oocysts dropped from 30,000 to 4,800. It is possible that a portion of this reduction in oocyst numbers may have been a consequence of successive centrifugations to rinse away sulfuric acid. The oocysts appeared morphologically normal immediately before inoculation; however they were not infective to gerbils.

The oocysts used in the current experiment were the remaining part of the oocysts used in other two studies (GONDIM *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2004b). The oocysts, when used after a few weeks of storage at 4°C in 2% sulfuric acid, were infective to gerbils that received 30 sporulated oocysts each (GONDIM *et al.*, 2002). Part of the oocysts stored up to 108 days at the same conditions, were infective to cows, which were orally administered 1,500 oocysts each (GONDIM *et al.*, 2004b).

In another experiment (TREES *et al.*, 2002) used doses of 1, 10, and 100 *N. caninum* oocysts to infect six gerbils; all animals seroconverted and *N. caninum* DNA was detected in 5/5 tested gerbils. Because gerbils have been previously demonstrated to be highly susceptible to infection with *N. caninum* oocysts, yet in the present study gerbils did not become infected with oocysts preserved for 46 months at 4°C in dilute sulfuric acid. We conclude that *N. caninum* oocysts do not survive 46 months in these conditions.

#### *Acknowledgements*

*The authors wish to thank Dr. Paulo Maiorka for helping with histopathological analyses and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) for the scholarship master degree.*

*This work was supported by FAPESB and JICA (Japan International Cooperation Agency).*

## 5. References

- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.60-61, p.417-431, 2000.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Vet Rec**, v.139, n.18, p.439-443, 1996.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **J Parasitol**, v.87, n.3, p.612-618, 2001.
- BURG, J.L.; GROVER, C.M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J.C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.27, n.8, p.1787-1792, 1989.
- CUDDON, P.; LIN, D.S.; BOWMAN, D.D.; LINDSAY, D.S.; MILLER, T.K.; DUNCAN, I.D.; DELAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M.; COOPER, B.; ET AL. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. **J Vet Intern Med**, v.6, n.6, p.325-332, 1992.
- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1647-1657, 1999.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J Am Vet Med Assoc**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol**, v.67, n.1-2, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitol Res**, v.86, n.2, p.165-168, 2000.
- DUMETRE, A.; DARDÉ, M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **FEMS Microbiol Rev**, v.27, n.5, p.651-661, 2003.
- GONDIM, L.F.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.; JESUS, E.E.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Vet Parasitol**, v.101, n.1, p.1-7, 2001.
- GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends Parasitol**, v.22, n.6, p.247-252, 2006.
- GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; MCALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **J Parasitol**, v.88, n.6, p.1159-1163, 2002.



- GONDIM, L.F.P.; MCALILSTER, M.M.; MATEUS-PINILLA, N.E.; PITT, W.C.; MECH, L.D.; NELSON, M.E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v.90, n.6, p.1361-1365, 2004a.
- GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; ANDERSON-SPRECHER, R.C.; BJORKMAN, C.; LOCK, T.F.; FIRKINS, L.D.; GAO, L.; FISCHER, W.R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.90, p.1394-1400, 2004b.
- GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v.34, n.2, p.159-161, 2004c.
- GONDIM, L.F.P.; SAEKI, H.; ONAGA, H.; HARITANI, M.; YAMANE, I. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v.47, p.36, 1999.
- JENKINS, M.C.; CAVER, J.A.; BJORKMAN, C.; ANDERSON, T.C.; ROMAND, S.; VINYARD, B.; UGGLA, A.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J.P. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. **Vet Parasitol**, v.94, n.1-2, p.17-26, 2000.
- MCALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitol Today**, v.15, n.6, p.216-217, 1999.
- MCALLISTER, M.M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **J Am Vet Med Assoc**, v.217, n.6, p.881-887, 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*. **Int J Parasitol**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.
- MCALLISTER, M.M.; HUFFMAN, E.M.; HIETALA, S.K.; CONRAD, P.A.; ANDERSON, M.L.; SALMAN, M.D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **J Vet Diagn Invest**, v.8, n.3, p.355-357, 1996.
- O'HANDLEY, R.; LIDDELL, S.; PARKER, C.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. **J Parasitol**, v.88, n.6, p.1120-1123, 2002.
- RODRIGUES, A.A.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.; DUBEY, J.P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Vet Parasitol**, v.124, n.3-4, p.139-150, 2004.
- TREES, A.; MCALLISTER, M.; GUY, C.; MCGARRY, J.; SMITH, R.; WILLIAMS, D. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Vet Parasitol**, v.109, n.1-2, p.147-154, 2002.
- YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **J Parasitol**, v.82, n.2, p.272-279, 1996.

#### 4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Poucos anos após a sua classificação, o protozoário *N. caninum* alcançou destaque como significativo agente causador de abortamentos em bovinos. Apesar de a transmissão transplacentária ter grande importância, já é provado que a transmissão horizontal, com a participação de cães, é necessária para a perpetuação do parasito nos rebanhos.

Ao contrário do que ocorre com *T. gondii*, oocistos de *N. caninum* são excretados em pequenas quantidades, dificultando a realização de experimentos acerca dos oocistos. Como consequência disso, oocistos de *N. caninum* ainda não foram avaliados ultra-estruturalmente, assim como os estágios intestinais que antecedem a formação dos oocistos do parasito ainda são desconhecidos.

Investigando a viabilidade de oocistos de *N. caninum* produzidos por infecção experimental em cães no ano de 2002, preservados em solução de ácido sulfúrico a 2% sob temperatura de refrigeração por 46 meses, verificou-se que os mesmos não são infectantes para gerbis, os quais são usados para o estudo da neosporose. Acredita-se que esses oocistos, apesar de morfologicamente intactos na avaliação microscópica, não foram capazes de invadir as células intestinais dos gerbis, uma vez que não foi observada reatividade de anticorpos no teste de imunofluorescência indireta ou, se houve invasão, os mesmos desenvolveram apenas imunidade intestinal o que pode ter sido suficiente para debelar o parasito e impedi-lo de se multiplicar, disseminar e causar doença nos animais.

Apesar de muitas informações referentes à *N. caninum* serem extrapoladas de estudos com *T. gondii*, o presente trabalho demonstrou que a viabilidade de oocistos de *N. caninum* nas condições apresentadas provavelmente difere de *T. gondii*, uma vez que estudos demonstram a viabilidade de oocistos de *T. gondii* por até 54 meses. Mais estudos sobre os oocistos, esporocistos e esporozoítos de *N. caninum* são necessários para um maior conhecimento da biologia do parasito.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMERIA, S.; FERRER, D.; PABON, M.; CASTELLA, J.; MANAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Vet Parasitol**, v.107, n.4, p.287-294, 2002.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.60-61, p.417-431, 2000.
- ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**, v.198, n.2, p.241-244, 1991.
- ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM, A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**, v.210, n.8, p.1169-1172, 1997.
- ANDERSON, T.; DEJARDIN, A.; HOWE, D.K.; DUBEY, J.P.; MICHALSKI, M.L. *Neospora caninum* antibodies detected in Midwestern white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) by Western blot and ELISA. **Vet Parasitol**, v.145, n.1-2, p.152-155, 2007.
- BAISHANBO, A.; GARGALA, G.; DELAUNAY, A.; FRANCOIS, A.; BALLEST, J.J.; FAVENNEC, L. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. **Infect Immun**, v.73, n.8, p.5252-5255, 2005.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Vet Rec**, v.139, n.18, p.439-443, 1996.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Int J Parasitol**, v.28, n.1, p.57-64, 1998.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Vet Rec**, v.137, n.24, 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. **J Vet Diagn Invest**, v.4, n.3, p.365-367, 1992.
- BARRINGTON, G.M.; PARISH, S.M. Bovine neonatal immunology. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.17, n.3, p.463-476, 2001.
- BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **J Parasitol**, v.87, n.3, p.612-618, 2001.
- BELLI, S.I.; SMITH, N.C.; FERGUSON, D.J. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! **Trends Parasitol**, v.22, n.9, p.416-423, 2006.
- BJERKAS, I.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.1, n.2, p.214-221, 1994.

- BJERKAS, I.; MOHN, S.F.;PRESTHUS, J.Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd**, v.70, n.2, p.271-274, 1984.
- BJORKMAN, C.; LUNDEN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBER, J.; TREES, A.J.;UGGLA, A.*Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunol**, v.16, n.12, p.643-648,1994.
- BJORKMAN, C.;UGGLA, A.Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1497-1507, 1999.
- BRESCIANI, K.D.; GENNARI, S.M.; SERRANO, A.C.; RODRIGUES, A.A.; UENO, T.; FRANCO, L.G.; PERRI, S.H.;AMARANTE, A.F.Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitol Res**, v.100, n.2, p.281-285, 2007.
- BURG, J.L.; GROVER, C.M.; POULETTY, P.;BOOTHROYD, J.C.Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.27, n.8, p.1787-1792, 1989.
- BURKE, T.J.Rats, mice, hamsters, and gerbils. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.9, n.3, p.473-486, 1979.
- BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K.M.; RAE, A.G.;INNES, E.A.The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **J Comp Pathol**, v.118, n.4, p.267-279, 1998.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M.M.;DUBEY, J.P.The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitol**, v.18, n.12, p.546-552, 2002.
- CANON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.; SOUZA, S.L.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.; DUBEY, J.P.;GENNARI, S.M.Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Vet Parasitol**, v.123, n.3-4, p.275-277, 2004.
- CHEAH, T.S.; MATTSSON, J.G.; ZAINI, M.; SANI, R.A.; JAKUBEK, E.B.; UGGLA, A.;CHANDRAWATHANI, P.Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. **Vet Parasitol**, v.126, n.3, p.263-269, 2004.
- CORBELLINI, L.G.; COLODEL, E.M.;DRIEMEIER, D.Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. **J Vet Diagn Invest**, v.13, n.5, p.416-419, 2001.
- CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D.R.;DRIEMEIER, D.Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **Vet J**, v.172, n.1, p.114-120, 2006a.
- CORBELLINI, L.G.; SMITH, D.R.; PESCADOR, C.A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D.J.;DRIEMEIER, D.Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Prev Vet Med**, v.74, n.2-3, p.130-141, 2006b.
- CUDDON, P.; LIN, D.S.; BOWMAN, D.D.; LINDSAY, D.S.; MILLER, T.K.; DUNCAN, I.D.; DELAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M.; COOPER, B.;ET AL.*Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. **J Vet Intern Med**, v.6, n.6, p.325-332, 1992.

- DE MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1647-1657, 1999.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J.W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Vet Parasitol**, v.105, n.2, p.99-104, 2002.
- DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int J Parasitol**, v.31, n.8, p.747-752, 2001.
- DOBROWOLSKI, J.M.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v.84, n.6, p.933-939, 1996.
- DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v.28, n.7, p.1019-1024, 1998a.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **J Parasitol**, v.84, n.4, p.862-865, 1998b.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet Parasitol**, v.84, n.3-4, p.349-367, 1999.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean J Parasitol**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol**, v.126, n.1-2, p.57-72, 2004.
- DUBEY, J.P.; ACLAND, H.M.; HAMIR, A.N. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. **J Parasitol**, v.78, n.3, p.532-534, 1992a.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int J Parasitol**, v.32, n.8, p.929-946, 2002a.
- DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **J Comp Pathol**, v.134, n.4, p.267-289, 2006.
- DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.192, n.9, p.1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J Am Vet Med Assoc**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J.P.; HOLLIS, K.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.; HUNGERFORD, L.; ANCHOR, C.; ETTER, D. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1709-1711, 1999.

- DUBEY, J.P.;LINDSAY, D.S.A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol**, v.67, n.1-2, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P.;LINDSAY, D.S.Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitol Res**, v.86, n.2, p.165-168, 2000.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ANDERSON, M.L.; DAVIS, S.W.;SHEN, S.K.Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **J Am Vet Med Assoc**, v.201, n.5, p.709-713, 1992b.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; HILL, D.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.; SILVA, J.C.; OLIVEIRA-CAMARGO, M.C.;GENNARI, S.M.Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. **J Parasitol**, v.88, n.6, p.1251-1252, 2002b.
- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L.;FRENKEL, J.K.The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **J Exp Med**, v.132, n.4, p.636-662, 1970.
- DUBEY, J.P.;PORTERFIELD, M.L.*Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **J Parasitol**, v.76, n.5, p.732-734, 1990.
- DUBEY, J.P.; RIGOULET, J.; LAGOURETTE, P.; GEORGE, C.; LONGEART, L.;LENET, J.L.Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). **J Parasitol**, v.82, n.2, p.338-339, 1996.
- DUBEY, J.P.;SCHARES, G.Diagnosis of bovine neosporosis. **Vet Parasitol**, v.140, n.1-2, p.1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v.20, n.2, p.323-67, 2007.
- DUMETRE, A.;DARDÉ, M.L.How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **FEMS Microbiol Rev**, v.27, n.5, p.651-661, 2003.
- ELENI, C.; CROTTI, S.; MANUALI, E.; COSTARELLI, S.; FILIPPINI, G.; MOSCATI, L.;MAGNINO, S.Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. **Vet Parasitol**, v.123, n.3-4, p.271-274, 2004.
- ELLIS, J.T.; MCMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.;HARPER, P.A.Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, 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, n.Pt 4, p.357-362, 1999b.
- ENTRICAN, G.Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J Comp Pathol**, v.126, n.2-3, p.79-94, 2002.
- FIGLIUOLO, L.P.; KASAI, N.; RAGOZO, A.M.; DE PAULA, V.S.; DIAS, R.A.; SOUZA, S.L.;GENNARI, S.M.Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from Sao Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol**, v.123, n.3-4, p.161-166, 2004.
- FRENCH, N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C.;TREES, A.J.Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1691-1704,1999.

- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. **J Parasitol**, v.59, n.3, p.587-588, 1973.
- FRENKEL, J.K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. **Am J Trop Med Hyg**, v.24, n.3, p.439-443, 1975.
- FUJII, H.; KAMIYAMA, T.; HAGIWARA, T. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. **Jpn J Med Sci Biol**, v.36, n.6, p.343-346, 1983.
- GENNARI, S.M.; RODRIGUES, A.A.; VIANA, R.B.; CARDOSO, E.C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. **Vet Parasitol**, v.134, n.1-2, p.169-171, 2005.
- GONDIM, L.F.; McALLISTER, M.M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Vet Parasitol**, v.134, n.1-2, p.33-39, 2005.
- GONDIM, L.F.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.; JESUS, E.E.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Vet Parasitol**, v.101, n.1, p.1-7, 2001.
- GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends Parasitol**, v.22, n.6, p.247-252, 2006.
- GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **J Parasitol**, v.88, n.6, p.1159-1163, 2002.
- GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; MATEUS-PINILLA, N.E.; PITT, W.C.; MECH, L.D.; NELSON, M.E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v.90, n.6, p.1361-1365, 2004a.
- GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; ANDERSON-SPRECHER, R.C.; BJORKMAN, C.; LOCK, T.F.; FIRKINS, L.D.; GAO, L.; FISCHER, W.R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.90, p.1394-1400, 2004b.
- GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v.34, n.2, p.159-161, 2004c.
- GONDIM, L.F.P.; SAEKI, H.; ONAGA, H.; HARITANI, M.; YAMANE, I. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Veterinary Journal**, v.47, p.36, 1999a.
- 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, 1999b.
- GUIMARAES, J.S., JR.; SOUZA, S.L.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. **Vet Parasitol**, v.124, n.1-2, p.1-8, 2004.
- HASSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Vet Parasitol**, v.117, n.3, p.213-220, 2003.

- HECKEROTH, A.R.;TENTER, A.M.Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*. **Parasitol Res**, v.100, n.4, p.837-846, 2007.
- HEMPHILL, A.The host-parasite relationship in neosporosis. **Adv Parasitol**, v.43, p.47-104, 1999.
- HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.;HEHL, A.The antigenic composition of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v.29, n.8, p.1175-1188,1999.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.;KAUFMANN, H.Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.112, n.Pt 2, p.183-197, 1996.
- HILALI, M.; LINDBERG, R.; WALLER, T.;WALLIN, B.Enigmatic cyst-forming sporozoan in the spinal cord of a dog. **Acta Vet Scand**, v.27, n.4, p.623-625, 1986.
- HOWE, D.K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSAY, D.;SIBLEY, L.D.The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, v.66, n.11, p.5322-5328,1998.
- HOWE, D.K.;SIBLEY, L.D.Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1489-1496,1999.
- HUANG, C.C.; TING, L.J.; SHIAU, J.R.; CHEN, M.C.;OOI, H.K.An abortion storm in cattle associated with neosporosis in Taiwan. **J Vet Med Sci**, v.66, n.4, p.465-467, 2004a.
- 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*). **Vet Res**, v.35, n.3, p.283-290, 2004b.
- HURKOVA, L.;MODRY, D.PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Vet Parasitol**, v.137, n.1-2, p.150-154, 2006.
- HURKOVA-HOFMANNOVA, L.; VACLAVEK, P.; SKORIC, M.; FICTUM, P.;MODRY, D.Multimammate rat (*Mastomys natalensis*), Tristram's jird (*Meriones tristrami*) and Wagner's gerbil (*Gerbillus dasyurus*) as laboratory models of acute neosporosis. **Res Vet Sci**, v.82, n.3, p.377-381, 2007.
- INNES, E.A.; ANDRIANARIVO, A.G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.;CONRAD, P.A.Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitol**, v.18, n.11, p.497-504, 2002.
- INNES, E.A.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; MALEY, S.; MACALDOWIE, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.;BUXTON, D.The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.108, n.1-2, p.29-36, 2005.
- JARDINE, J.E.The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. **Vet Parasitol**, v.62, n.3-4, p.231-240, 1996.
- JENKINS, M.C.; CAVER, J.A.; BJORKMAN, C.; ANDERSON, T.C.; ROMAND, S.; VINYARD, B.; UGGLA, A.; THULLIEZ, P.;DUBEY, J.P.Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. **Vet Parasitol**, v.94, n.1-2, p.17-26, 2000.
- JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.;DUBEY, J.P.*Neospora caninum* detected in feral rodents. **Vet Parasitol**, v.143, n.2, p.161-165, 2007.



- KOESTNER, A.; COLE, C.R. Neuropathology of canine toxoplasmosis. **Am J Vet Res**, v. September, p.831-844, 1960.
- KOIWAI, M.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; SHIMIZU, S.; ZENIYA, Y.; ETO, M.; YOKOYAMA, R.; TSUTSUI, T.; KIMURA, K.; YAMANE, I. Nationwide seroprevalence of *Neospora caninum* among dairy cattle in Japan. **Vet Parasitol**, v.135, n.2, p.175-179, 2006.
- KVAC, M.; KVETONOVA, D.; SALAT, J.; DITRICH, O. Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. **Parasitol Res**, v.100, n.2, p.213-217, 2007.
- LEMBERGER, K.Y.; GONDIM, L.F.P.; PESSIER, A.P.; McALLISTER, M.M.; KINSEL, M.J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent Canine Distemper Virus infection. **Journal of Parasitology**, v.91, p.960-961, 2005.
- LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1583-1587, 1999.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. **Vet Parasitol**, v.103, n.4, p.309-313, 2002.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **Am J Vet Res**, v.50, n.11, p.1981-1983, 1989.
- LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet Parasitol**, v.82, n.4, p.327-333, 1999a.
- LINDSAY, D.S.; RITTER, D.M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **J Parasitol**, v.87, n.4, p.909-911, 2001a.
- LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1521-1523, 1999b.
- LINDSAY, D.S.; WESTON, J.L.; LITTLE, S.E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Vet Parasitol**, v.97, n.2, p.159-164, 2001b.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.; JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Vet Rec**, v.153, n.12, p.366-367, 2003.
- LYONS, R.E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v.18, n.5, p.198-201, 2002.
- MACALDOWIE, C.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **J Comp Pathol**, v.131, n.2-3, p.142-156, 2004.
- MALEY, S.W.; BUXTON, D.; RAE, A.G.; WRIGHT, S.E.; SCHOCK, A.; BARTLEY, P.M.; ESTEBAN-REDONDO, I.; SWALES, C.; HAMILTON, C.M.; SALES, J.; INNES, E.A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. **J Comp Pathol**, v.129, n.2-3, p.186-195, 2003.

- MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J Parasitol**, v.84, n.5, p.983-991, 1998.
- McALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitol Today**, v.15, n.6, p.216-217, 1999.
- McALLISTER, M.M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **J Am Vet Med Assoc**, v.217, n.6, p.881-887, 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*. **Int J Parasitol**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998a.
- McALLISTER, M.M.; HUFFMAN, E.M.; HIETALA, S.K.; CONRAD, P.A.; ANDERSON, M.L.; SALMAN, M.D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **J Vet Diagn Invest**, v.8, n.3, p.355-357, 1996.
- McALLISTER, M.M.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; LINDSAY, D.S.; MCGUIRE, A.M.; TRANAS, J.D. Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. **Am J Vet Res**, v.59, n.4, p.441-444, 1998b.
- McGARRY, J.W.; STOCKTON, C.M.; WILLIAMS, D.J.; TREES, A.J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. **J Parasitol**, v.89, n.3, p.628-630, 2003.
- McINNES, L.M.; IRWIN, P.; PALMER, D.G.; RYAN, U.M. In vitro isolation and characterisation of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. **Vet Parasitol**, v.137, n.3-4, p.355-363, 2006a.
- McINNES, L.M.; RYAN, U.M.; O'HANDLEY, R.; SAGER, H.; FORSHAW, D.; PALMER, D.G. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Vet Parasitol**, v.142, n.3-4, p.207-213, 2006b.
- MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.O. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. **Parasitol Res**, v.86, n.2, p.169-178, 2000.
- NAGULESWARAN, A.; HEMPHILL, A.; RAJAPAKSE, R.P.; SAGER, H. Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. **Vet Parasitol**, v.126, n.3, p.257-262, 2004.
- O'HANDLEY, R.; LIDDELL, S.; PARKER, C.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. **J Parasitol**, v.88, n.6, p.1120-1123, 2002.
- OSAWA, T.; WASTLING, J.; MALEY, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. **Vet Parasitol**, v.79, n.1, p.19-34, 1998.
- O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Vet Rec**, v.121, n.24, p.563-566, 1987.
- PARE, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. **J Vet Diagn Invest**, v.7, n.2, 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. **J Am Vet Med Assoc**, v.191, n.12, p.1599-1600, 1987.
- PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **Int J Parasitol**, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001a.
- PETERS, M.; WOHLSEIN, P.; KNIERIEM, A.; SCHARES, G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). **Vet Parasitol**, v.97, n.2, p.153-157, 2001b.
- PIPANO, E.; SHKAP, V.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; PERL, S.; ORGAD, U. Susceptibility of *Psammomys obesus* and *Meriones tristrami* to tachyzoites of *Neospora caninum*. **J Parasitol**, v.88, n.2, p.314-319, 2002.
- QUINN, H.; ELLIS, J.; SMITH, N. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? **Trends Parasitol**, v.18, n.9, p.391, 2002.
- RAMAMOORTHY, S.; SRIRANGANATHAN, N.; LINDSAY, D.S. Gerbil model of acute neosporosis. **Vet Parasitol**, v.127, n.2, p.111-114, 2005.
- REICHEL, M.P.; DRAKE, J.M. The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.44, p.151-154, 1996.
- RODRIGUES, A.A.; GENNARI, S.M.; AGUIAR, D.M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; VIANNA, M.C.; DUBEY, J.P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Vet Parasitol**, v.124, n.3-4, p.139-150, 2004.
- SAGER, H.; GLOOR, M.; BJORKMAN, C.; KRITZNER, S.; GOTTSTEIN, B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. **Vet Parasitol**, v.112, n.1-2, p.1-10, 2003.
- SAWADA, M.; PARK, C.H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T.; HARITANI, M. Pathological findings of nude mice inoculated with bovine *Neospora*. **J Vet Med Sci**, v.59, n.10, p.947-948, 1997.
- SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F.J.; MEHLHORN, H. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. **Parasitol Res**, v.87, n.10, p.873-877, 2001a.
- SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F.J.; MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitol Res**, v.87, n.10, p.808-816, 2001b.
- SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, 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. **Parasitol Res**, v.88, n.1, p.44-52, 2002.
- SLAPETA, J.R.; MODRY, D.; KYSELOVA, I.I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Vet Parasitol**, v.109, n.3-4, p.157-167, 2002.
- SOLDATI, S.; KIUPEL, M.; WISE, A.; MAES, R.; BOTTERON, C.; ROBERT, N. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**, v.51, n.6, p.280-283, 2004.

- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M.; BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v.29, n.10, p.1509-1519, 1999.
- SPEER, C.A.; TILLEY, M.; TEMPLE, M.E.; BLIXT, J.A.; DUBEY, J.P.; WHITE, M.W. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. **Mol Biochem Parasitol**, v.75, n.1, p.75-86, 1995.
- SUZUKI, M.; TSUNEMATSU, Y. Susceptibility of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867) to *Toxoplasma* infection. **Ann Trop Med Parasitol**, v.68, n.1, p.33-39, 1974.
- THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **J Vet Diagn Invest**, v.1, n.3, p.205-209, 1989.
- TIEMANN, J.C.; RODRIGUES, A.A.; DE SOUZA, S.L.; DUARTE, J.M.; GENNARI, S.M. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. **Vet Parasitol**, v.129, n.3-4, p.341-343, 2005.
- TILLEY, M.; FICHERA, M.E.; JEROME, M.E.; ROOS, D.S.; WHITE, M.W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. **Infect Immun**, v.65, n.11, p.4598-4605, 1997.
- TREES, A.; McALLISTER, M.; GUY, C.; McGARRY, J.; SMITH, R.; WILLIAMS, D. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. **Vet Parasitol**, v.109, n.1-2, p.147-154, 2002.
- TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitol**, v.21, n.12, p.558-561, 2005.
- VIANNA, M.C.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Vet Parasitol**, v.129, n.3-4, p.253-257, 2005.
- VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.; MINEO, T.W.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Vet Parasitol**, v.122, n.4, p.253-260, 2004.
- WALSH, C.P.; DUNCAN, R.B.; ZAJAC, A.M.; BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D.S. *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils, and dogs. **Vet Parasitol**, v.92, n.2, p.119-128, 2000.
- WILLIAMS, D.J.; GUY, C.S.; McGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P.J.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v.121, n.Pt 4, p.347-358, 2000.
- WILLIAMS, D.J.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; GUY, F.; McGARRY, J.W.; MCKAY, J.S.; TREES, A.J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol**, v.33, n.10, p.1059-1065, 2003.
- WOODS, L.W.; ANDERSON, M.L.; SWIFT, P.K.; SVERLOW, K.W. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **J Vet Diagn Invest**, v.6, n.4, p.508-510, 1994.

- YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.;GOTTSTEIN, B.*Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **J Parasitol**, v.82, n.2, p.272-279, 1996.
- YILMAZ, S.M.;HOPKINS, S.H.Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **J Parasitol**, v.58, n.5, p.938-939, 1972.
- YUKAWA, M.Differential susceptibility of two stocks of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) to *Leptospira*. **J Exp Anim Sci**, v.34, n.1, p.1-5,1991.
- YUKAWA, M.; MOCHIZUKI, K.;IMAMURA, S.Susceptibility of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) to leptospire and the protective effect of vaccination. **Vet Microbiol**, v.24, n.1, p.63-71,1990.

# 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](#)