

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

UILLIANS VOLKART DE OLIVEIRA

**FREQUÊNCIA, DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DE COCCÍDIOS DE
IMPORTÂNCIA EM MEDICINA VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA, EM
EQUÍDEOS DESTINADOS AO ABATE**

**ILHÉUS – BAHIA
2019**

UILLIANS VOLKART DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DE COCCÍDIOS DE
IMPORTÂNCIA EM MEDICINA VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA, EM
EQUÍDEOS DESTINADOS AO ABATE**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz

**ILHÉUS – BAHIA
2019**

O48 Oliveira, Uillians Volkart de.
Prevalência, diagnóstico e isolamento de coccídios de importância em medicina veterinária e saúde pública, em equídeos destinados ao abate / Uillians Volkart de Oliveira. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.
xiv, 94 f. : il. ; anexos.

Orientador: Alexandre Dias Munhoz.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Referências e apêndices.

1. Equino – Doenças. 2. Toxoplasma gondii. 3. Toxoplasmose em animais. 4. Parasitologia veterinária. 5. Protozoário. I. Título.

CDD 636.1089

UILLIANS VOLKART DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DE COCCÍDIOS DE
IMPORTÂNCIA EM MEDICINA VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA,
EQUÍDEOS DESTINADOS AO ABATE**

Ilhéus – BA, ___/___/___

Alexandre Dias Munhoz – *DSc*
UESC/DCAA - Orientador

Amauri Arias Wenceslau – *DSc*
UESC/DCAA

Luis Fernando Pita Gondim– *DSc*
UFBA

Sônia Carmen Lopo Costa – *DSc*
CCZ - Itabuna

Rodrigo Alves Bezerra - *DSc*
Faculdade Madre Thaís

**ILHÉUS – BAHIA
2019**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por minha entrada neste mundo, por uma família e amigos maravilhosos, pelos meus professores, por uma boa educação e pela grande oportunidade de desfrutar deste conhecimento existente.

Ao professor Dr. Alexandre Dias Munhoz, que foi meu orientador desde a iniciação científica, que me deu a oportunidade de desenvolver trabalhos tanto na área de pesquisa quanto na extensão em seu laboratório, e dessa forma fazendo com que desenvolvesse meu conhecimento e senso crítico.

Ao Dr. Gideão Silva Galvão, por ter sido a primeira pessoa que acompanhei em um projeto de pesquisa, sendo também uma das influências que tive para que permanecesse na academia.

Aos meus colegas de Laboratório: Aisla Nascimento, Luciana Lacerda, Sônia Carmen Lopo Costa, Gabriela Mota, Ana Graziela Deiró, José Varjão, Jéssica Freitas, Rebeca Dately, Fabiana Barbosa e Anna Luiza, que deram sua contribuição no desenvolvimento deste projeto de doutorado assim como o seu afeto e amizade.

Meus amigos Clebson Pereira de Almeida, Ivanildo dos Anjos Santos, Sandro Modesto, Gustavo Mello e Eduardo Braga que em todo este período sempre estiveram presente.

Para minha família, começando por minha mãe Maria Tereza Volkart, meu pai José Alves de Oliveira, meus irmão Wagner Volkart e Erweuter Volkart, minha cunhada Sônia Xavier, meus sobrinhos Miguel e Thiago, E minha noiva Thaise da Silva Oliveira Costa que sempre estiveram comigo neste período, tanto em momentos de alegrias como de tristezas, além do apoio incondicional para a realização de mais esta etapa em minha vida.

Aos amigos que apesar da distância continuam sempre mantendo contato, quando possível: Diana Campos, Rosana Sousa e Fabio Josino. Aos amigos que acabei fazendo no exterior durante o meu doutorado Sanduíche: a minha orientadora no exterior Dra. Helga Waap e ao colega Dr Jacinto Gomes.

A CAPES e a FAPESB pelas bolsas que me foram ofertadas durante o período de doutorado, é a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) por toda infraestrutura que me foi ofertada em todos esses anos em que estive presente.

PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DE COCCÍDIOS DE IMPORTÂNCIA EM MEDICINA VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA, EM EQUÍDEOS DESTINADOS AO ABATE

RESUMO

Objetivou-se determinar a prevalência, diagnóstico e isolamento de coccídios de importância em medicina veterinária e saúde pública em equídeos destinados ao abate, em um frigorífico no sul do Brasil. Participaram do estudo 354 equídeos, sendo colhidas amostras de sangue de todos os animais e 328 amostras de masseter e cérebro. Foi utilizada a reação de imunofluorescência indireta para determinação da prevalência de *Besnoitia* sp., *Neospora* sp., *Sarcocystis* sp e *Toxoplasma gondii*. Realizou-se a detecção molecular de *Neospora* sp., *Sarcocystis* sp. e *Toxoplasma gondii*, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), em 264 das amostras de tecidos colhidas. Na tentativa de isolamento de *T. gondii* e *Neospora* sp. utilizou-se o bioensaio em camundongos e gerbis, respectivamente. Os animais inoculados foram acompanhados por 60 dias, posteriormente, foram eutanasiados, sendo colhido sangue para sorologia, e fragmentos de cérebro, fígado, pulmão, baço e coração para histopatologia e detecção molecular dos parasitos. Para avaliar o resultado da sorologia dos animais e a presença de DNA do parasito nos tecidos, para *T. gondii*, utilizou-se a correlação de Spermann.e o teste do Qui-quadrado. A soroprevalência para *Sarcocystis* sp. foi de 44,63%(158/354), para *Neospora* sp. 9,32% (33/354), *Besnoitia* sp 5,36% (19/354) e, *T. gondii* 19,21% (68/354). Todas as amostras positivas na sorologia para *Besnoitia* sp. foram negativas no Western Blotting. Um total de 28,8% (15/52) dos camundongos, que receberam inóculos oriundos de 11 equinos foram positivos na *nested*-PCR para *T. gondii*. Um total de 28,8% (15/52) dos camundongos, que receberam inóculos de 60% (12/20) dos equinos (*Equus caballus*) foram positivos para *T. gondii*. Destes camundongos, 7,7% (4/52) tiveram algum órgão positivo na *nested*-PCR, 5,8% (3/52) dos camundongos foram positivos apenas na sorologia e 15,4% (8/52) dos camundongos foram positivos tanto na sorologia, quanto na *nested*-PCR. Os tecidos positivos no bioensaio foram três masseteres, 11 cérebros e um *pool* de masseter mais cérebro. Na *nested*-PCR 5,3%(14/264) dos equinos foram positivos para *T. gondii*, em oito cérebros e em seis masseteres, além disso houveram um fígado e um coração positivos. A correlação de spermann e o teste do qui-quadrado não foram significativos. Não houve isolamento de *Neospora* sp, nem identificação molecular nos tecidos dos equídeos e gerbis. Em 17,68% (58/328) das amostras de masseter de equídeos foram encontrados cistos com características de coccídios. Em 33,7% (89/264) dos equinos e em um dos três muares (*Equus caballus* x *Equus asinus*) tiveram amostras de masseter positivas na *nested* PCR para *Sarcocystis* sp., em 63,8% (37/58) houve uma associação entre o diagnóstico molecular e a histopatologia. 12 destas amostras foram sequenciadas e todas tiveram a variação da identidade de 89 a 97% para *S. bertrami*. Com os resultados deste estudo pode-se concluir que *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. e *Neospora* sp. estão presentes em equinos clinicamente saudáveis na região sul do Brasil, que há possibilidade do risco de infecção por *T. gondii* na população humana através do consumo *in natura* de carne de

equídeos e que a identificação de *S. bertrami* na musculatura dos equídeos caracteriza estes como reservatórios aqui no Brasil.

Palavras - Chave: *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp., frigorífico, *Nespora* sp., *Besnoitia* sp.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine prevalence and diagnosis of infection and isolation of coccidia of veterinary medicine importance and public health, in equidae destined to slaughter in the south of Brazil. A total of 354 equidae participated in the study. Blood samples were collected from all animals, besides 328 samples of masseter and brain. Indirect immunofluorescence reaction (IFAT) was used for serological diagnosis of *Besnoitia* sp., *Neospora* sp., *Sarcocystis* sp. and *Toxoplasma gondii*. Polymerase chain reaction (PCR) was used for diagnosis of infection by *Neospora* sp., *Sarcocystis* sp. and *Toxoplasma gondii* in 264 of tissue samples collected. In an attempt to isolate *T. gondii* and *Neospora* sp. the bioassay was used in mice and gerbils, respectively. Inoculated animals were followed during 60 days, later euthanized. Blood was collected for IFAT. Brain, liver, lung, spleen and heart fragments were collected for histopathology and molecular detection of parasite. Seroprevalence for *Sarcocystis* sp. was 44.63% (158/354), for *Neospora* sp. 9.32% (33/354), *Besnoitia* sp. 5.36% (19/354) and, *T. gondii* 19.21% (68/354). All positive samples in the serology for *Besnoitia* sp. were negative in Western blotting. In the conventional PCR, all the samples of equines and mice were negative for *T. gondii* and *Neospora* sp. A total of 15 of the 52 mice (28.8%) were positive for *T. gondii*, with tissues from 60% (12/20) equines (*Equus caballus*). Of these mice, 7,7% (4/52) were positive in the nested PCR and 5,8% (3/52) were positive only in serology. There was an association of 15,4% (8/52) positive mice in IFAT and nested PCR. Isolated tissues were 3 masseters, 11 brains and 1 pool of masseter plus brain. In the nested PCR, 5.3% of the equines were positive for *T. gondii* (14/264), and in 8 of these the brains were positive and 6 horses had positive masseter, in addition we had one positive liver and one positive heart. The correlation of spermann and the chi-square test were not significant. There was no isolation of *Neospora* sp., without molecular identification in equine and gerbils tissues. In 17.68% (58/328) of equine masseter samples, cysts with coccidia characteristics were found in the histopathology. In 33.7% (89/264) horses and of mule (*Equus caballus* x *Equus asinus*) had one masseter positive samples in the nested PCR for *Sarcocystis* sp. In 63.8% (37/58) of these positive samples there was an association with cysts in the histopathology. 12 of these samples were sequenced and all had the identity variation of 89-97% for *S. bertrami*. With the results of this study, we can conclude that *T. gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora* sp. are present in clinically healthy horses in southern Brazil. Therefore, there is a possibility of *T. gondii* infection in human population through *in natura* consumption of equine meat. Furthermore, the identification of *S. bertrami* in equine musculature characterizes it a reservoirs in Brazil.

Key Words: *Toxoplasma gondii*; *Sarcocystis* sp; slaughtered; *Nespora* sp; *Besnoitia* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detecção de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> pela PCR em amostras de cerebro camundongos	46
Figura 2. Detecção de DNA de <i>Sarcocystis</i> sp. pela PCR em amostras de masseter de equinos destinados ao consumo humano	58
Figura 3. Cistos de coccídios em masseter positivos para <i>Sarcocystis</i> sp. na nested PCR	59
Figura 4. Diagrama de Venn do status sorológico dos equídeos soropositivos para coccídeos de importância em medicina veterinária em equídeos abatidos em um frigorífico no sul do Brasil	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de epidemiologia e bioensaio para <i>Toxoplasma gondii</i> realizados em equídeos oriundos de frigorífico pelo mundo	24
Tabela 2. Estudos de epidemiologia e identificação histopatológica de <i>Sarcocystis</i> sp. em equídeos pelo mundo	29
Tabela 3. Estudos de prevalência para <i>Neospora</i> sp. realizados em equídeos oriundos pelo mundo	36
Tabela 4. Resultado da sorologia, <i>nested</i>-PCR e da PCR em tempo real para <i>Toxoplasma gondii</i>, nos camundongos e equídeos positivos	50
Tabela 5. Resultado da quantificação de taquizoítos nos camundongos soropositivos na RIFI através da PCR em tempo real	51
Tabela 6. Tipo de cistos encontrados em amostras de masseter de equídeos abatidos em um frigorífico no sul do Brasil	59
Tabela 7. Resultado do sequenciamento de 12 amostras de masseter positivas para <i>Sarcocystis</i> sp. de equídeos abatidos em um frigorífico no sul do Brasil	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RIFI	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA
EPM	MIELOENCEFALITE PROTOZOÁRIA EQUINA
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
MAPA	MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
ELISA	ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA
MAT	TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA
SFDT	TESTE DO CORANTE DE SABIN-FELDMAN
MET	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO
q-PCR	PCR EM TEMPO REAL
MC-PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE CAPTURA MAGNÉTICA
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
WB	WESTERN BLOTTING

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
1. INTRODUÇÃO	15
2.0. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.0. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	18
3.1.1. Etiologia	18
3.1.2. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
3.1.3. Epidemiologia de <i>Toxoplasma gondii</i> em equídeos destinados ao abate.....	20
3.1.4. Riscos à saúde pública devido ao consumo da carne de equídeos contaminada com <i>T. gondii</i>	21
3.2. <i>Sarcocystis</i> sp. em equídeos	22
3.2.1. Etiologia	22
3.2.2. Ciclo biológico.....	23
3.2.3. <i>Sarcocystis bertrami</i> e <i>Sarcocystis fayeri</i> (sin. <i>Sarcocystis equicanis</i> ; <i>Sarcocystis asinus</i>)?	25
3.2.4. Epidemiologia de <i>Sarcocystis</i> sp. em equídeos	26
3.2.5. <i>Sarcocystis</i> sp. e saúde pública.....	27

3.2.6. Diagnóstico entre as espécies de <i>Sarcocystis</i> spp.....	28
3.3. <i>Neospora</i> sp.	30
3.3.1. Etiologia	30
3.3.2. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	30
3.3.3. <i>Neospora</i> sp. em equinos.....	31
3.3.4. Epidemiologia de <i>Neospora</i> sp. em equídeos	32
3.3.5. <i>Neospora</i> sp. em humanos	33
3.3.6. Diagnóstico entre <i>Neospora caninum</i> e <i>Neospora hughesi</i>	33
3.4. Besnoitia e besnoitiose	33
4.0. CAPÍTULO 1	37
ISOLAMENTO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM MASSETERES DE EQUINOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO, ABATIDOS EM UM FRIGORÍFICO DO SUL DO BRASIL.....	37
4.1. INTRODUÇÃO	38
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.2.1 Coleta de sangue e tecido.....	39
4.2.2. Reação de imunofluorescência indireta para <i>Toxoplasma gondii</i>	40
4.2.3. Ensaio Biológico para <i>Toxoplasma gondii</i>	40
4.2.4. Coleta de tecido e sangue dos camundongos.....	41
4.2.5. Histopatologia	41
4.2.6. Extração do DNA.....	41
4.2.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional	42
4.2.8. Nested PCR para detecção molecular de <i>T. gondii</i>	42
4.2.9. PCR para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	43

4.2.10. PCR em tempo Real (q-PCR).....	43
4.2.11. Sequenciamento	44
4.2.12. Análise estatística.....	44
4.3. RESULTADOS	45
4.3.1. Resultado dos equídeos.....	45
4.3.2. Resultado dos camundongos	45
4.3.3. Sequenciamento	46
4.3.4. Análise estatística	46
4.4. DISCUSSÃO	46
4.5. CONCLUSÃO	49
5.0. 2 CAPÍTULO	52
DETECÇÃO E ESTRUTURAÇÃO MOLECULAR DE CISTOS DE SARCOCYSTIS BERTRAMI EM MUSCULATURA DE EQUÍDEOS ABATIDOS EM UM FRIGORÍFICO NO SUL DO BRASIL.	52
5.1. INTRODUÇÃO	53
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	54
5.2.1. Coleta de tecido.....	54
5.2.2. Histopatologia	54
5.2.3. Extração do DNA.....	55
5.2.4. Reação em cadeia da polimerase	55
5.2.5. PCR para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	56
5.2.6. Sequenciamento	56
5.3. RESULTADOS	57
5.3.1. PCR e Histopatologia	57
5.3.2. Sequenciamento	58

5.4. DISCUSSÃO	58
5.5. CONCLUSÃO	61
6.0. CAPÍTULO 3	62
FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-SARCOCYSTIS SP., ANTI-NEOSPORA SP. E ANTI-BESNOITIA SP. EM EQUÍDEOS ORIUNDOS DE UM FRIGORÍFICO NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E BIOENSAIO EM GERBIS (<i>MERIONES UNGUICULATUS</i>) PARA <i>NEOSPORA</i>.....	62
6.1. INTRODUÇÃO	63
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
6.2.1. Coleta de sangue e tecido	64
6.2.2. Reação de imunofluorescência indireta para <i>Besnoitia</i> sp, <i>Neospora</i> sp. e <i>Sarcocystis</i> sp.	65
6.2.3. Western blotting para <i>Besnoita</i> sp.	65
6.2.4. Ensaio Biológico para <i>Neospora</i> sp.	66
6.2.5. Coleta de tecido e sangue dos gerbis.....	66
6.2.6. Sorologia dos gerbis.....	66
6.2.7. Histopatologia	67
6.2.8. Extração do Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	67
6.2.9. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional.....	67
6.2.10. PCR para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	68
6.3. RESULTADOS	68
6.3.1. Resultado dos equinos	68
6.3.2. Resultado dos Gerbis	69
6.4. DISCUSSÃO	69
6.5. CONCLUSÃO	72

7.0. CONCLUSÕES GERAIS	73
8.0. REFERÊNCIAS.....	74
9.0. APRESENTAÇÃO DA APROVAÇÃO DO PROTOCOLO POR COMITÊ DE ÉTICA.....	89
10.0. APÊNDICES	90
10.1. APÊNDICE A	90
11. ANEXOS	92
11.1. ANEXO A	92
11.2. ANEXO B	93
11.3. ANEXO C	93

1. INTRODUÇÃO

O Brasil detém o maior rebanho de equídeos da América Latina e o terceiro maior rebanho mundial, composto por mais de 8 milhões de cabeças. No entanto, esses números não são refletidos na indústria do abate. No período de 2008 a 2017 foram abatidos apenas 369.243 equídeos em frigoríficos brasileiros. O equídeo está ligado principalmente ao lazer, cultura, esporte e trabalho, ficando o abate para o consumo da carne destinado principalmente à exportação.

O Brasil já foi considerado o terceiro maior exportador de carne de cavalo do mundo. Porém, devido as novas regras da União Europeia, que passou a ter exigências para a importação de carne de equídeos semelhantes as praticadas para a bovina, houve uma diminuição e, por conseguinte, prejuízo nas exportações brasileiras, pois a maioria dos equídeos abatidos e exportados no Brasil eram de trabalho, não possuíam registro e nem acompanhamento. Porém, mesmo com a queda nas exportações, ainda possui um papel de destaque no que se refere à exportação de carne equina, tendo Europa e Ásia como principais mercados consumidores. No período de 2012 a 2017, os principais importadores de carne equina foram Bélgica, seguido pela Rússia, Japão, Vietnã, Itália, Holanda e demais países.

Os equídeos podem ser hospedeiros de coccídios de importância em saúde pública como *Toxoplasma gondii* que podem causar cefaléia, mialgia, dores articulares, febre e aumento dos gânglios linfáticos, perda de visão, aborto e morte em pacientes com doenças imunocompetentes como a Aids através do consumo da carne crua ou mal passada contendo cistos de *T. gondii*. O *Sarcocystis fayeri* pode levar a casos de náuseas, vômitos e diarreia através do consumo da carne equídea contendo cistos de *S. fayeri*.

Os equídeos também podem albergar coccídios de importância em medicina veterinária como *Sarcocystis neurona*, principal causador da mieloencefalite protozoária equina (EPM), que afeta diretamente o Sistema Nervoso Central (SNC), causando função anormal da via aérea superior, claudicação incomum ou atípica, convulsões, dificuldade em se levantar, caminhar ou engolir, e a doença pode progredir muito rapidamente. *Neospora hughesi* e o segundo maior causador da EPM e a *Besnoitia bennetti* que podem levar a presença de nódulos

parasitários sobre a pele, rosto, corpo, interior das narinas e membros do equídeos.

Este estudo será apresentado em três capítulos, sendo o primeiro relacionado ao isolamento do *T. gondii* em camundongos através de tecidos oriundos de equídeos, o segundo capítulo se trata do diagnóstico molecular de *Sarcocystis bertrami* no masseter dos equídeos e o terceiro capítulo sobre a prevalência em equídeos de parasitos do filo Apicomplexa de importância em medicina veterinária.

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência, diagnóstico e isolamento de coccídios de importância em saúde pública e medicina veterinária em equídeos destinados ao abate.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *T. gondii* e *Neospora* sp. em tecidos de equídeos destinados ao abate;
- Determinar a prevalência de *S. bertrami* em musculatura de equídeos destinados ao consumo humano, através da detecção molecular e da microscopia;
- Determinar a soroprevalência em equídeos oriundos de um frigorífico no Rio Grande do Sul para *Besnoitia* sp., *Neospora* sp. e *Sarcocystis* sp.

3.0. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Toxoplasma gondii*

3.1.1. Etiologia

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, classe Coccidia. Possui como hospedeiro definitivo os felídeos (DUBEY et al., 1970) e como hospedeiros intermediários mamíferos e aves (TENTER, 2000; DUBEY; JONES, 2008). A infecção por *T. gondii* pode ocorrer através da via transplacentária, passada da fêmea gestante para o feto; por carnivorismo, pela ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo cistos teciduais e; oral pelo consumo acidental de oocistos do ambiente, através de água ou alimento contaminados (DUBEY, 2008), é por meio de transplante de órgãos em seres humanos (KHURANA; BATRA, 2016). Uma pequena porcentagem de humanos e animais desenvolvem sinais clínicos da doença. Além disso é importante destacar a variabilidade genética entre isolados de *T. gondii* de hospedeiros aparentemente saudáveis e doentes (DUBEY; JONES, 2008).

Em herbívoros, a infecção ocorre principalmente através da ingestão de oocistos esporulados no ambiente durante o pastejo e, em menor escala, por transmissão vertical, quando os taquizoítos atravessam a barreira transplacentária infectando o feto (DUBEY, 1996; DUBEY, 2010). Embora os equídeos sejam vistos como resistentes à infecção, há relatos de toxoplasmose em infecções naturais, ocasionando anormalidades na vascularização da placenta, com detecção do DNA do parasito no líquido amniótico (TURNER; SAVVA, 1990). Em outro relato detectou-se o DNA do parasito na retina, coróide e esclera de um poney de 17 anos morto repentinamente (TURNER; SAVVA, 1991). Em infecções experimentais os principais sinais são de hipertermia, lacrimejamento, corrimento ocular e apatia em infecções experimentais (SPÓSITO FILHA et al, 1992).

A infecção por *T. gondii* em humanos é, na maioria das vezes, assintomática ou apresenta sintomas comuns a outras infecções, como uma gripe, por exemplo, dor de cabeça, mialgia, dores articulares, febre e aumento

dos gânglios linfáticos são comuns na fase aguda da toxoplasmose. Alguns indivíduos podem apresentar doença grave ou severa, com quadros de encefalite quando possuem um sistema imune deficiente, sendo a toxoplasmose uma das doenças que mais causa morte entre os pacientes com AIDS. A transmissão transplacentária pode levar ao aborto ou a uma infecção congênita, sendo as lesões oculares e no sistema nervoso central as mais observadas nos neonatos (DUBEY, 1996; HILL et al, 2005; DUBEY, 2010).

3.1.2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

A fase sexuada ocorre quando oocistos esporulados, cistos ou taquizoítos são ingeridos pelo gato. Os oocistos irão liberar os esporozoítos no lúmen intestinal, enquanto que os cistos irão liberar os bradizoítos. Após a formação do trofozoíto, estes irão penetrar nas células epiteliais do intestino, dando origem ao processo de esquizogonia. No final deste processo, os merozoítos liberados, invadirão novas células epiteliais iniciando o processo de gametogonia formando os gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). Os microgametas irão fecundar os macrogametas formando o zigoto, que será formado por uma parede resistente, evoluindo para oocisto. Os felídeos eliminam em suas fezes oocistos não esporulados que, esporulam em condições ambientais propícias como temperatura, umidade e oxigenação, tornando-se infectantes no período de 3 a 7 dias. O oocisto esporulado possui dois esporocistos, cada um com 4 esporozoítos. Durante a fase sexuada milhões de oocistos podem ser liberados nas fezes dos gatos por um período que dura 7 a 21 dias. Os oocistos esporulados sobrevivem no ambiente por 12 a 18 meses se os fatores climáticos como umidade e temperatura forem favoráveis, ou seja, solo úmido e sombreado. Se a temperatura for de 4°C, eles sobrevivem por até 54 meses, 106 dias a -16°C, mas morrem em dois minutos a 60°C (DUBEY 1998a; KAWAZOE; MINEO et al., 2011).

A fase extraintestinal é caracterizada por apresentar somente a reprodução assexuada com desenvolvimento de taquizoítos e bradizoítos, podendo ocorrer tanto no hospedeiro intermediário quanto no hospedeiro definitivo. Esta fase começa quando oocistos ou cistos teciduais ingeridos liberam respectivamente, esporozoítos ou bradizoítos, estes invadem os enterócitos, se transformam em

taquizoítos, ganham a circulação sistêmica ou linfática e se disseminam em diversos tecidos, Estes multiplicam-se por endodiogenia, um processo no qual são produzidas duas células-filhas no interior da célula mãe. Após o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, em torno de 7 a 10 dias após a infecção, se convertem em bradizoítos formando os cistos, que podem permanecer por toda vida na maioria dos hospedeiros, predominantemente no cérebro ou musculatura. Por fim, caso a infecção no hospedeiro ocorra durante a gravidez, o parasita pode atravessar a placenta e infectar o feto (infecção congênita) (DUBEY, 1998; 2009; DUNCANSON et al., 2001).

3.1.3. Epidemiologia de *Toxoplasma gondii* em equídeos destinados ao abate

Estudos sorológicos realizados em diferentes partes do mundo (Tabela 1) mostram uma prevalência para *T. gondii* variando de 6,9 a 48,6%. Portella et al., (2017) em um frigorífico no sul do Brasil encontraram 47,2% de positividade, enquanto que em outro frigorífico no sul do Brasil, Evers et al, (2013) encontraram 11,6% de equinos positivos. No exterior, Yang et al., (2013) no nordeste da China encontraram 24,3% de equídeos positivos enquanto que Xing et al., (2018) encontraram 5,4% no noroeste da China. Papini et al., (2015) e Klun et al., (2017) encontraram, na Europa, uma soroprevalência de 17,6% e 48,6% na Itália e Sérvia, respectivamente.

Além destes estudos sorológicos, também já foram realizados estudos moleculares. Papini et al. (2015) selecionaram amostras de coração, língua e diafragma oriundas de nove equinos soropositivos para a realização de uma *nested* PCR, obtendo assim três equídeos positivos para as amostras de coração. Pastiu et al., (2015), por sua vez, ao analisarem tecidos cardíacos de 82 equinos pela PCR, que obtiveram 39% de soropositividade pelo ELISA, não encontraram animais positivos para *T. gondii*. Evers et al. (2013) realizaram a PCR do cérebro de 14 equinos positivos no bioensaio de camundongos, destes, dois foram positivos. É importante destacar que nenhum dos 14 equinos positivos no bioensaio foram positivos na RIFI. Aroussi et al., (2015) encontraram 43% (99/243) de amostras de carne equina de supermercado positivas para *T. gondii* através da Reação em cadeia da polimerase de captura magnética (MC-

PCR). Klun et al. (2017) encontraram cistos nos tecidos de duas éguas, sendo que uma foi soropositiva no MAT para *T. gondii* na diluição de 1:6 e a outra soronegativa. Por fim Pena et al. (2018) conseguiram obter um isolado oriundo de 13 equinos soropositivos no MAT com ponto de corte de 1:25.

Embora haja uma ampla distribuição de exposição ao parasito, a infecção em equídeos costuma ser assintomática, devido a uma possível resistência destes ao parasito (DUBEY, 2010). As diferenças de positividade encontradas nos diferentes locais podem estar associadas a fatores epidemiológicos tais como diferentes tipos de criação, higiene dos estábulos e diferentes tipos de alimentação (TENTER et al., 2000).

3.1.4. Riscos à saúde pública devido ao consumo da carne de equídeos contaminada com *T. gondii*

Na França, um caso de infecção congênita por *T. gondii* em um recém nascido, confirmada através da PCR do sangue e sorologia teve fortes indícios de ser em decorrência do consumo de carne equina, visto que a mãe da criança relatou o consumo da carne crua várias vezes durante a gestação. O sangue do recém nascido foi utilizado no bioensaio de camundongos, com morte de todos os camundongos 9 dias após a inoculação (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009). Ainda na França, foram descritos três casos de toxoplasmose humana, causadas por cepas atípicas de *T. gondii*, provavelmente por ingestão de carne crua de equinos importados do Brasil e do Canadá. Dentre os três pacientes, um era um homem de 74 anos e que, apesar de um tratamento específico para o parasito, não resistiu e morreu no 27º dia após a admissão no hospital. O segundo paciente era uma mulher grávida, na qual foi constatada toxoplasmose congênita por detecção de IgM no soro do recém-nascido e o terceiro paciente, também uma mulher grávida, que teve a gravidez interrompida na 26ª semana de gestação e a necropsia do feto relatou vários abscessos cerebrais (POMARES et al., 2011).

Pastiu et al. (2015) selecionaram, para bioensaio em camundongos, o tecido cardíaco de 32 equinos soropositivos. Como resultado, foram encontrados dois camundongos com cérebros positivos para *T. gondii* na PCR. Klun et al. (2017) utilizaram para bioensaio em camundongos, o tecido cardíaco, em 104

equinos oriundos de dois frigoríficos da Sérvia, três camundongos que abrigavam cistos cerebrais tiveram títulos altos na RIFI (1:5120). Além disso, foi observada alta letalidade dos camundongos nas passagens seguintes. Por fim, Aroussi et al., (2015) encontraram 43% (99/243) de amostras de carne de supermercado positivas para *T. gondii* através da MC-PCR.

Diante do exposto, estes estudos demonstram que existe a possibilidade de seres humanos adquirirem toxoplasmose através da ingestão de carne crua ou mal passada de equídeos, sendo importante, como medida preventiva, que toda carne proveniente destes animais seja consumida bem cozida (HILL; DUBEY, 2002).

3.2. *Sarcocystis* sp. em equídeos

3.2.1. Etiologia

O gênero *Sarcocystis* é composto por parasitas intracelulares e alberga espécies que possuem o ciclo heteroxeno obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa. Os parasitos deste gênero já foram descritos em várias partes do mundo, sendo relatadas mais de 150 espécies. Mamíferos, aves, répteis e, possivelmente, peixes se infectam com espécies do gênero (FAYER et al., 2015). Cinco espécies de *Sarcocystis* já foram relatadas em equídeos, sendo elas, *S. fayeri*, *S. bertrami*, *S. equicanis*, *S. asinus* e *S. neurona* (ROMMEL; GEISEL, 1975; DUBEY, 1977; GADAEV, 1978; HINAIDY; LOUPAL, 1982; DUBEY et al., 2015).

Equídeos se mostram bastante susceptíveis à infecção por determinadas espécies de *Sarcocystis* tais como *S. fayeri* e *S. Bertrami*, que podem levar a casos de pirexia, anemia leve (FAYER; DUBEY, 1982) além de fraqueza muscular, ataxia, perda de peso (CAWTHORN et al., 1990), granulomatose (HERD et al., 2015), atrofia muscular, déficit de marcha e disfagia (ALEMAN et al., 2016). *S. neurona*, por sua vez, é o agente causador da mieloencefalite protozoária equina (EPM), uma doença progressivamente debilitante que afeta o sistema nervoso central dos cavalos. Os sinais clínicos podem variar desde o início insidioso de sinais focais ou multifocais de doença neurológica envolvendo o encéfalo, tronco encefálico, medula espinhal ou

qualquer combinação das áreas do sistema nervoso central (SNC). Alguns cavalos afetados com EPM têm função anormal da via aérea superior, claudicação incomum ou atípica ou até mesmo convulsões. Nos casos mais graves, o cavalo pode ter dificuldade em se levantar, caminhar ou engolir, e a doença pode progredir muito rapidamente. Em alguns cavalos, a doença parece estabilizar ou permanecer estática por um período de tempo (DUBEY et al., 2015).

3.2.2. Ciclo biológico

Os ciclos biológicos de *S. neurona*, *S. fayeri* e *S. bertrami* são similares, embora envolvam diferentes espécies de hospedeiros definitivos. Os gambás do gênero *Didelphis* são os hospedeiros definitivos envolvidos nas infecções por *S. neurona* (DUBEY et al., 2001b). Os cães (*Canis lupus familiaris*), por sua vez, são os hospedeiros definitivos envolvidos nas infecções por *S. fayeri* e *S. bertrami* (ROMMEL; GEISEL et al., 1975; DUBEY et al., 1977; MATUSCKA, 1983).

Os hospedeiros intermediários, incluindo equídeos, se infectam pela ingestão de esporocistos presentes no ambiente. Após a ingestão dos esporocistos, os esporozoítos são liberados no intestino delgado e a parasitemia é detectada entre 1 a 8 dias (DUBEY et al., 2001cd). Após estabelecida a infecção, os merozoítas de *S. neurona* tendem a permanecer no tecido nervoso, onde ocorrerá o processo de esquizogonia, que poderá formar centenas de merozoítos em apenas um neurônio (DUBEY et al., 2001c). Os esquizontes se dividem por endopoligenia, onde o núcleo se torna multilobulado antes da formação dos merozoítos (SPEER; DUBEY, 2001). *Sarcocystis fayeri* e *S. bertrami*, por sua vez, tendem a formar cistos na musculatura esquelética, coração, esôfago, diafragma e língua (HILALI; NASSAR, 1987; FUKUYO et al., 2002; ALEMAN et al., 2016).

Tabela 1. Estudos de epidemiologia e bioensaio para *Toxoplasma gondii* realizados em equídeos oriundos de frigorífico pelo mundo

País	Teste utilizado	Ponto de corte	N	Positivos (%)	Tecido/bioensaio	Referência
México, Canadá e Estados Unidos	MAT ¹	1:20	1788	6,9	-	Dubey et al., (1999 ^a)
China	MAT ¹	1:25	1449	24,3	-	Yang et al., (2013)
México	MAT ¹	1:25	239	10,9	-	Alvarado-Esquivel et al. (2015)
Itália	RIFI ²	1:20	153	17,6	-	Papini et al., (2015)
Romênia	ELISA ³	1:10	82	39,0	-	Pastiu et al., (2015)
Romênia	MAT ¹	1:6	82	37,8	-	Pastiu et al., (2015)
Sérvia	MAT ¹	1:6	106	48,6	-	Klun et al., (2017)
China	ELISA ³	1:200	409	5,4	-	Xing et al., (2018)
Estados Unidos	SFDT ⁴	1:2	500	10	Coração, medula espinhal e esôfago.	Al-Khalidi; Dubey, (1979)
Brasil	RIFI ²	1:64	398	11,6	-	Evers et al., (2013)
Brasil	RIFI ²	1:16	561	31,5	-	Vidotto et al., (1997)
Brasil	RIFI ²	1:50	197	47,2	-	Portella et al., (2017)
Brasil	BM ⁵	NP	398	3,5	Cérebro	Evers et al., (2013)
Brasil	BM ⁵	NP	13	7,7	Cérebro e coração	Pena et al., (2018)
Romênia	BM ⁵	NP	32	6,25	Coração	Pastiu et al., (2015)
França	BM ⁵	NP	118	0	Musculatura esquelética	Aroussi et al., (2015)
Sérvia	BM ⁵	NP	104	2,88	Coração	Klun et al., (2017)

¹Teste de aglutinação modificada; ²Reação de imunofluorescência Indireta; ³Ensaio de imunoabsorção enzimática; ⁴ Teste do Corante de Sabin-Feldman; ⁵Bioensaio em camundongos; NP = não se aplica.

A infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de tecidos infectados com os bradizoítos. Estudos demonstram que o período pré-patente para *S. fayeri* e *S.bertrami* pode variar desde 8 dias (ROMMEL;GEISE et al., 1975), 9-10 dias (MATUSCKA, 1983) e 12 a 15 dias (DUBEY et al., 1977). Já para *S. Neurona*, pode variar de 11 a 13 dias (DUBEY et al., 2000). Os oocistos possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Os equinos se infectam após ingerirem estes esporocistos ou oocistos presentes na fezes do cão (DUBEY et al., 1977; 2015).

3.2.3. *Sarcocystis bertrami* e *Sarcocystis fayeri* (sin. *Sarcocystis equicanis*; *Sarcocystis asinus*)?

O primeiro relato de cistos de *Sarcocystis* em equídeos ocorreu na Alemanha em 1872 (SIEDAMGROTZKY, 1872 apud DUBEY et al., 2016), sendo nomeado *S. bertrami* (DOFLEIN, 1901 apud DUBEY et al., 2016). Rommel e Geisel (1975) ao analisarem cistos de equinos, identificaram uma nova espécie denominada *S. equicanis*, no entanto, de acordo com Levine & Tadros (1980), esta espécie pode ser um sinônimo de *S. bertrami*. Gadaev (1978) encontrou cistos de *Sarcocystis* em jumentos e classificou-lhes como uma nova espécie denominada *Sarcocystis asinus*. Este autor baseou essa nova classificação apenas em tamanho, forma e coloração dos bradizoítos. No entanto, essas diferenças são insustentáveis como forma de definir uma nova espécie, já que diferenças na morfologia do bradizoítos podem estar relacionadas a diferentes técnicas utilizadas (LEVINE; TADROS, 1980; ODENING, 1998; DUBEY et al., 2016), além disso, a morfologia dos cistos pode mudar com a idade (FAYER et al., 2015).

Outros estudos que identificaram cistos em equídeos consideraram os cistos com características de *S. bertrami* após análise microscópica (HINAIDY; LOUPAL, 1982; EDWARDS, 1984; KIRMSE, 1986). Recentemente Dubey et al. (2016) ao analisarem cistos de 19 jumentos através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão, considerou os cistos como de *S. bertrami*.

Dubey et al. (1977) realizaram um estudo experimental com equinos e cães. Ao compararem os seus achados com o estudo elaborado por Rommel e

Geisel (1975), observaram características diferentes relacionadas ao tamanho de esporocistos e período pré-patente. Diante disso, estes autores chegaram à conclusão que se tratava de uma nova espécie, denominando-a de *S. fayeri*. Recentemente, Aleman et al. (2016) e Coultous et al. (2017), respectivamente, confirmaram geneticamente a presença de *S. fayeri* nas Américas em cistos na musculatura de equinos e na África no sangue de um jumento. No entanto ainda não foi realizado nenhum estudo nas Américas que buscasse identificar cistos de *S. fayeri* ou *S. bertrami* na musculatura de equídeos destinados ao abate.

Em geral, ainda existe uma confusão quanto à validade das diferentes espécies de *Sarcocystis* em equídeos. Acredita-se que todos os equídeos compartilham espécies comuns de *Sarcocystis*, no entanto, mais estudos são necessários para essa confirmação (MATUSCKA, 1983; DUBEY et al., 2016). Diante disso, Zeng et al. (2018) questionam se *S. fayeri* e *S. bertrami* seriam realmente parasitas diferentes, pois eles acreditam, de acordo com as evidências morfológicas, que existe apenas uma espécie que infecta cavalos e jumentos, propondo assim que seu achado seja denominado *S. bertrami* por ter sido a primeira espécie descrita em cavalos. Por fim, Murata et al. (2018) ao analisarem amostras de carnes importadas do Japão, Canadá e Itália, encontraram carnes positivas dos 3 países, sendo todas caracterizadas como *S. fayeri*.

3.2.4. Epidemiologia de *Sarcocystis* sp. em equídeos

Estudos sobre a prevalência de *Sarcocystis* sp. realizados em diferentes partes do mundo mostram resultados, variando desde 10% a 93% (Tabela 2). A maioria destes estudos foram realizados através da visualização microscópica de cistos no esôfago, diafragma, língua e coração. Além disso, em alguns destes estudos os equídeos foram abatidos em frigoríficos destinados ao consumo humano, o que enfatiza a relevância destes estudos (KIMRSE, 1986; EDWARDS, 1984; FUKUYO et al, 2002).

Outros estudos que não exploraram a prevalência, também demonstraram a presença do *Sarcocystis* em equídeos. Aleman et al. (2016) ao investigarem casos de equídeos com doenças neuromusculares nos Estados Unidos, descobriram a presença de cistos na musculatura destes animais,

confirmando posteriormente através da PCR e sequenciamento que se tratava do *S. fayeri*. Já na Gâmbia, Coultous et al. (2017) estavam investigando casos de piroplasmose em equídeos, porém uma das amostras do sangue de um jumento produziu uma banda inespecífica e foi enviada para o sequenciamento, sendo posteriormente confirmado como *S. fayeri*. Murata et al. (2018) verificaram que pelo menos uma das amostras de carnes de equídeos oriundas do Japão, Canadá e Itália foram positivas para *S. fayeri* através da PCR e sequenciamento.

Estudos sorológicos realizados em equídeos para *S. neurona*, (Tabela, 2), demonstraram prevalências que variaram de zero % na Coreia do Sul (GUPTA et al., 2002) a 48,5% no México (YEARGAN et al., 2013). Na Região Sul do Brasil, Antonello et al., (2015) e Portella et al., (2017), encontraram, respectivamente, 33,86% e 39,1% de equinos soropositivos, (Tabela, 2). Possui como hospedeiros definitivo o gambá (*Didelphis virginiana* na América do Norte e o *Didelphis albiventris* na América do Sul) (DUBEY et al., 2015). Morley et al. (2008) citaram que equinos criados em pastagens são mais propensos à infecção por *S. neurona* do que animais estabulados. Além disso, fatores ambientais podem influenciar na predisposição à EPM, como aqueles relativos à localização (PUSTERLA et al., 2014b), ao clima (DUBEY et al., 2015;), ao relevo e à hidrografia (MORLEY et al., 2008).

3.2.5. *Sarcocystis* sp. e saúde pública

O hábito de comer carne crua é comum em alguns países europeus e asiáticos. No Japão, muitas pessoas apresentaram náusea, vômitos, diarreia e outras condições patológicas pouco tempo após o consumo de carne de cavalo crua, no entanto, nenhuma bactéria e agentes virais foram identificados em qualquer alimento suspeito. Após estes exames iniciais, amostras dessas carnes foram avaliadas por meio de provas parasitológicas tais como microscopia, bioensaio e PCR, nas quais foram confirmadas a presença do *S. fayeri* (HARADA et al., 2013; KAMATA et al., 2014; MURATA et al., 2018).

Este potencial risco de intoxicação alimentar de *Sarcocystis* sp. está relacionado à presença de uma fração protéica no parasita, que pode agir como toxina (KAMATA et al., 2014; IRIKURA et al., 2017). Esta informação torna-se importante pois existem relatos de equídeos positivos para *Sarcocystis* oriundos

de frigoríficos que podem, portanto, ser fontes de intoxicação para humanos (FUKUYO et al., 2002; PORTELLA et al., 2017; MURATA et al., 2018). No entanto, medidas preventivas simples, como o congelamento da carne são suficientes para prevenir casos de intoxicação (HARADA et al., 2013).

3.2.6. Diagnóstico entre as espécies de *Sarcocystis* spp.

Testes sorológicos entre diferentes espécies de *Sarcocystis* são muito reativos e podem provocar reações cruzadas (TENTER et al., 1995). Antonello et al. (2015) realizaram um estudo comparativo através da RIFI com lâminas produzidas com antígenos de *S. neurona* e *S. cruzi*, usando uma amostragem de 189 éguas. Destas 33,86% (64/189) e 80,42% (152/189) foram positivas respectivamente para *S. Neurona* e *S. Cruzi*, sendo que, 159 reagiram a pelo menos um dos parasitos e 57 reagiram aos dois antígenos, o que pode indicar infecções associadas ou reação cruzada. Além disso, em um estudo sorológico para *Sarcocystis* sp. em equinos abatidos em frigoríficos, houve uma soroprevalência na RIFI de 39,1% (77/197), com lâminas produzidas através de antígeno de *S. neurona* (SN-37R) (PORTELLA et al., 2017). É possível a ocorrência de reação cruzada entre *S. neurona* e *S. fayeri* na prova de aglutinação e RIFI, no entanto, a infecção pode ser distinguida através do Western Blotting devido a presença de antígenos específicos (TENTER et al., 1995; SAVILLE et al., 2004).

Em relação a provas moleculares, O PCR, seguido do sequenciamento, passaram a ser realizados para o diagnóstico de *S. Fayeri* e *S. Bertrami*. (ALEMAN et al., 2016; COULTOUS et al., 2017; MURATA et al., 2018; ZENG et al., 2018), possuindo, desta forma, uma maior confiabilidade na identificação do parasita.

Tabela 2. Estudos de epidemiologia e identificação histopatológica de *Sarcocystis* sp. em equídeos pelo mundo

País	N	Positivos %	Técnica	Tecido	Ponto de corte	Espécie	Referência
URSS	20	40	Microscopia	-	-	Asinino	Gadaev et al., (1978)
Áustria	2	50	Microscopia	Esôfago	-	Asinino	Hinaidy & Loupal (1982)
Áustria	275	32,3	Microscopia	Esôfago	-	Equino	Hinaidy & Loupal (1982)
Inglaterra	394	62,2	Microscopia	Esôfago	-	Equino	Edwards (1984)
Egito	41	21,9	Microscopia	Esôfago	-	Asinino	Kirmse (1986)
Egito	119	46,2	Microscopia	Esôfago	-	Equino	Kirmse (1986)
Egito	20	90	Microscopia	Esôfago, diafragma e coração	-	Asinino	Hilali; Nassar (1987)
Mongólia	43	93	Microscopia	Diafragma, coração e língua	-	Equino	Fukuyo et al., 2002
Brasil	197	39,1	RIFI ¹	Sangue	1:50	Equino	Portella et al., (2017)
Brasil	189	33,9	RIFI ¹	Sangue	1:50	Equino	Antonello et al., (2015)
México	495	48,5	ELISA ²	Sangue	1:100	Equino	Yeargan et al., (2013)
China	32	15	Microscopia		-	Equino	Zeng et al., (2018)
China	42	10	Microscopia	Sangue	-	Asininos	Zeng et al., (2018)
Estados Unidos	3123	27,6	RIFI ¹	Sangue	1:80	Equinos	Pusterla et al., (2014b)
Coreia do Sul	191	0	Western blotting	Sangue	1:100	Equinos	Gupta et al., (2002)
Costa Rica	315	42,2	ELISA ²	Sangue	1:100	Equinos	Dangoudoubiyam et al. (2011)

¹Reação de imunofluorescência Indireta; ²Ensaio de imunoabsorção enzimática.

3.3. *Neospora* sp.

3.3.1. Etiologia

Neospora caninum e *N. hughesi* são protozoários coccídios formadores de cisto, pertencentes ao filo Apicomplexa (MARSH et al. 1998). *Neospora caninum* possui o cão (*Canis familiaris*), coiote (*Canis latrans*), dingo australiano (*Canis lupus dingo*) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) como hospedeiros definitivos (MCALLISTER et al. 1998; GONDIM et al. 2004, KING et al., 2010, DUBEY et al., 2011). Os hospedeiros definitivos eliminam oocistos no ambiente, contaminando o solo, a água e os alimentos (DUBEY, 1999). O hospedeiro definitivo de *N. hughesi* ainda se mantém desconhecido (DUBEY et al. 2001a; WALSH et al. 2001). Diferentemente de *N. caninum*, que já foi encontrado em uma variedade de espécies animais, atuando como hospedeiros intermediários no seu ciclo biológico (GONDIM 2006; DUBEY; SCHARES et al. 2007), *N. hughesi* foi identificado até o momento apenas na espécie equina, embora a possibilidade de ser encontrado em outras espécies não seja descartada (GONDIM et al., 2009). Estes animais infectam-se por meio da ingestão de oocistos esporulados, cistos teciduais ou por transmissão vertical (DUBEY 1999).

3.3.2. Ciclo biológico de *Neospora caninum*

Os canídeos, hospedeiros definitivos (HD), são infectados ao consumir tecidos contendo cistos do parasito (MCALLISTER et al., 1998), oriundos de hospedeiros intermediários. A parede do cisto é degradada pela ação do suco gástrico liberando as formas parasitárias (DUBEY & LINDSAY, 1996). Em seguida, ocorre um provável desenvolvimento no intestino, com liberação dos oocistos nas fezes. Uma vez esporulados no ambiente, o oocisto torna-se infectante dentro de um período de 24 horas, em condições ambientais ideais, sendo capaz de infectar novos hospedeiros intermediários (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999). Os oocistos esporulados possuem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (DUBEY e al., 2002). O período pré-

patente é de cinco dias ou mais a partir da ingestão de cistos teciduais (LINDSAY et al., 1999). Uma vez ingeridos por hospedeiros intermediários, os oocistos passam pelo estômago e duodeno, juntamente com o alimento, sofrem digestão química e enzimática e liberam os esporozoítos no trato gastrointestinal. Estes se transformam em taquizoítos, que se replicam por endodiogenia, tendo acesso as vias sanguíneas e linfáticas (DUBEY et al., 1999c; DUBEY, 2003). A rápida replicação de taquizoítos é limitada *in vivo* a cerca de 20 divisões (período de aproximadamente 3 semanas) antes de se diferenciarem em bradizoítos, que formam cistos nos tecidos. Os bradizoítos lentamente se replicam assexuadamente por endodiogenia. Os cistos teciduais são tipicamente encontrados no cérebro, na medula espinhal ou na musculatura esquelética (DUBEY et al., 1990; PETERS et al., 2001) e podem persistir por longos períodos no hospedeiro intermediário sem causar manifestações clínicas significativas (DUBEY; LINDSAY, 1996). Após os canídeos ingerirem os tecidos contendo estes cistos, em aproximadamente 7 dias começam a eliminar oocistos não esporulados nas suas fezes (DIJKSTRA et al., 2002; CAVALCANTE et al., 2011).

3.3.3. *Neospora* sp. em equinos

A neosporose em equinos foi diagnosticada pela primeira vez no início da década de 90, através da visualização de taquizoítos em cortes de pulmão de um feto abortado, já demonstrando a possibilidade da transmissão transplacentária nestes animais (DUBEY; PORTERFIELD 1990). Neste período, o protozoário *N. caninum* já era conhecido como um patógeno de bovinos e cães (BJERKAS et al. 1984; THILSTED; DUBEY, 1989).

O primeiro relato de *Neospora* sp. em um equino com doença neurológica ocorreu em 1996, na Califórnia, em um animal de 19 anos com quadro neurológico que evoluiu para paraplegia (DAFT et al., 1996). O mesmo foi submetido a eutanásia, sendo visualizado cistos nos tecidos e um título sorológico de 1280 para anticorpos anti-*Neospora* sp. através da RIFI (DAFT et al., 1996). No mesmo ano, Lindsay et al. (1996) identificaram cistos de *Neospora* sp. no cérebro de um potro, demonstrando que as lesões que ocorrem em potros recém nascidos são similares às encontrada em bezerros. Ainda em 1996, foi relatado o isolamento *in vitro* de *Neospora* sp. a partir de um equino com sinais

clínicos e testes laboratoriais compatíveis com Mieloencefalite Protozoária Equina (MPE). Estes estudos colocaram o protozoário como o segundo agente causador de mieloencefalite em equinos, além de *S. neurona* (MARSH et al. 1996). Testes moleculares realizados com um protozoário oriundo da medula espinhal de um equino da Califórnia demonstraram diferenças no espaço interno transcrito 1 (ITS 1) do rDNA em relação a uma cepa de *N. caninum* que mantinham no cultivo, sendo então denominado de *Neospora hughesi* (MARSH et al. 1998).

Além disso, um isolado de *N. hughesi* oriundo do sistema nervoso de um equino com problemas neurológicos, que recebeu dexametasona intramuscular (0,2 mg/kg), intencionalmente, com o intuito de aumentar a carga parasitária (HAMIR et al., 1998; DUBEY et al., 2001), foi confirmado através da PCR, sequenciamento e Western blotting (DUBEY et al., 2001).

3.3.4. Epidemiologia de *Neospora* sp. em equídeos

Estudos de prevalência em equídeos oriundos de propriedades demonstram que a soropositividade para *Neospora* sp. em equídeos já foi relatada em várias partes do mundo como nos Estados Unidos (DUBEY et al., 1999; CHEADLE e al., 1999), na Itália (CIARAMELLA et al., 2004; BARTOVA et al., 2015), Iran (TAVALLA et al., 2015), Brasil (TOSCAN et al., 2011; CAZAROTO et al., 2016; PORTELLA et al., 2017) e China (CONG et al., 2018), com variação da prevalência de 8 a 48,27% (Tabela 3).

Estudos demonstram que condições ambientais, métodos de amostragem, tipos de testes diagnósticos utilizados, idade (animais mais velhos), regiões, acesso de cães e animais silvestres a fonte de água dos equídeos, consumo somente de pasto (ausência de feno), compra informal de animais e ausência de período de quarentena podem ser considerados fatores de risco a infecções (DUBEY et al., 1999 c,d; VALENÇA et al., 2015; CAZAROTO et al., 2016; BARTOVA et al., 2017). Além destes fatores, a transmissão vertical possui uma importância considerável no ciclo de *Neospora* sp., sendo também relatada em equídeos (PUSTELA et al., 2014; QUEVEDO et al., 2015).

3.3.5. *Neospora* sp. em humanos

Dois fetos de macacos e duas macacas prenhes foram inoculados com taquizoítos de *N. caninum* em experimentos distintos, sendo observado nos dois experimentos lesões em tecido nervoso e a identificação de *N. caninum*. Com isso, pôde-se confirmar a possibilidade da infecção de *N. caninum* em primatas (BARR et al., 1994). No Brasil, Costa et al. (2018) detectaram DNA de *N. caninum* através da *Nested-PCR* no sangue, cérebro, pulmão, rim e fígado, além da visualização, durante a histologia, de taquizoítos no tecido cardíaco de um macaco da noite de vida livre (*Aotus Azarae*).

Além disso, outros estudos demonstram a possibilidade dos seres humanos apresentarem títulos sorológicos para *N. caninum* (TRANAS et al., 1999; IBRAHIM et al., 2009; OSHIRO et al., 2015). No entanto, ainda não houve o isolamento do parasito, deixando em aberto uma lacuna sobre a existência de um potencial zoonótico de *Neospora* sp. (TRANAS et al., 1999; IBRAHIM et al., 2009; OSHIRO et al., 2015).

3.3.6. Diagnóstico entre *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*

Os testes mais utilizados para a detecção de anticorpos anti-*Neospora* sp. em equinos são a RIFI, ELISA e Western blotting. No entanto, a falta de um teste que diferencie *N. caninum* de *N. hughesi* tem dificultado a realização de estudos epidemiológicos sobre *N. hughesi* (MARSH et al., 1998; 1999). Foi desenvolvido um teste ELISA com o antígeno recombinante NhSAG1 de *N. hughesi*, porém o mesmo não foi suficiente para diferenciar infecções por *N. caninum* ou *N. hughesi* nos animais testados (HOANE et al. 2005), sendo necessário o desenvolvimento de algum estudo de triagem que consiga realizar essa diferenciação (GONDIM et al., 2009). A diferenciação destes parasitos somente é possível mediante a obtenção de DNA para PCR e sequenciamento (MARSH et al. 1999; SPENCER et al. 2000).

3.4. Besnoitia e besnoitiose

Besnoitiose é uma infecção causada por protozoários do gênero *Besnoitia* sp.. Estes protozoários são coccídios formadores de cistos que afetam bovinos, equídeos e outros hospedeiros (DUBEY et al., 2005; ELLIS et al., 2000; VENTURINI et al., 2002). O ciclo de vida e modo de transmissão da *Besnoitia* sp. em equídeos permanece desconhecido (OLIAS et al., 2011). Os sinais clínicos dessa doença em equídeos são caracterizados por nódulos parasitários sobre a pele, rosto, corpo, interior das narinas e membros (DUBEY et al., 2005; NESS et al., 2012).

A besnoitiose equina, causada pelo *B. bennetti* (BENNETT, 1927; BENNETT, 1933), já foi relatada acometendo equídeos na África do Sul, Estados Unidos e Bélgica (SCHULZ; THORBURN, 1955; DUBEY et al., 2005; LIENARD et al., 2018). Nos Estados Unidos Dubey et al. (2005) encontraram cistos de *B. bennetti* na pele de quatro jumentos, confirmando o diagnóstico posteriormente através da RIFI, imunohistoquímica e provas moleculares. Ainda nos Estados Unidos Ness et al. (2014) realizaram um estudo com 416 jumentos, sendo que 32 foram confirmados para *B. bennetti* através da histologia, além disso, realizaram uma comparação através de ensaios e sensibilidade com os jumentos negativos e positivos, demonstrando que a RIFI associada com o Western blotting se torna uma ferramenta eficaz no diagnóstico da *B. bennetti* em jumentos.

Na Europa, estudos foram realizados na Espanha por Gutierrez-Expósito et al. (2017), que detectaram 7,1% (46/721) de equídeos soropositivos para *Besnoitia* sp. através do ELISA. Porém, estas amostras tiveram reação cruzada com *Neospora* sp. e/ou *Sarcocystis* sp. Na Itália, Villa et al. (2018) encontraram 7,83% (21/268) equinos e 22,22% (4/18) jumentos soropositivos no ELISA. Porém, foram confirmados no Western blotting apenas 0,74% (2/268) dos equinos, enquanto que os 4 jumentos permaneceram positivos. Na Bélgica, Lienard et al. (2018) relataram um caso de um jumento de 2 anos de idade em condições precárias (caquexia, áreas alopecicas e prurido nas regiões do pescoço e cabeça). Foi realizado biopsia de pele neste animal, em locais onde foram visualizados cistos sugestivos de besnoitiose. Posteriormente, foi feito diagnóstico laboratorial, o qual foi conclusivo para *B. bennetti* através do Western blotting, q-PCR e sequenciamento.

Na América do Sul existem poucos trabalhos realizados com *Besnoítia* sp., havendo apenas relatos em marsupiais (NAIFF et al., 1983) e coelhos (VENTURINI et al., 2002).

Tabela 3. Estudos de Epidemiologia para *Neospora* sp. realizados em equídeos

País	Teste utilizado	Ponto de corte	N	Positivos (%)	Referência
México, Canadá e Estados Unidos	NAT ¹	1:20	296	23,3	Dubey et al., 1999d
Brasil	RIFI ²	1:50	197	39,1	Portella et al., 2017
Itália	RIFI ²	1:50	643	2,3	Bartova et al., 2015
Itália	RIFI ²	1:50	115	28	Ciaramella et al., 2004
Irã	NAT ¹	1:40	235	20	Tavalla et al., 2015
Estados Unidos	RIFI ²	1:50	536	11,5	Cheadle et al., 1999
China	ELISA ³	*	2228	9,5	Cong et al., 2018
Paquistão	ELISA ³	*	631	23,3	Nazir et al., 2018
Nigéria	RIFI ²	1:50	144	8	Bartova et al., 2017
Brasil	RIFI ²	1:50	214	15,9	Toscan et al., 2011
Brasil	RIFI ²	1:50	174	48,3	Cazaroto et al., 2016
Brasil	RIFI ²	1:50	427	18	Valença et al., 2015

¹Teste de aglutinação para *Neospora* (NAT); ²Reação de imunofluorescência Indireta;

³Ensaio de imunoabsorção enzimática; * Recomendação do fabricante do kit

4.0. CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO DE *TOXOPLASMA GONDII* EM MASSETERES DE EQUINOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO, ABATIDOS EM UM FRIGORÍFICO DO SUL DO BRASIL

4.1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório de distribuição mundial (DUBEY, 2010) pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, classe Coccidia. Possui como hospedeiro definitivo os felídeos (DUBEY et al., 1970), que podem eliminar milhões de oocistos no ambiente, após uma primo-infecção (DUBEY, 1998a), e como hospedeiros intermediários, mamíferos e aves (TENTER et al., 2000). Os equídeos, em virtude dos seus hábitos alimentares, se infectam através da ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente (DUBEY, 2010).

A exposição por *T. gondii* em equídeos destinados ao consumo humano já foi relatada, através da sorologia, nas América do Norte e Sul, Europa e Ásia, com positividade variando de 5,4 à 48,6% (AL-KHALIDI; DUBEY, 1979; DUBEY et al., 1999a; YANG et al., 2013; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2015; PAPINI, 2015; PASTIU et al., 2015; KLUN et al., 2017; XING et al., 2018;). No Brasil a positividade encontrada variou de 11,6 à 47,2% (VIDOTTO et al., 1997; EVERS et al., 2013; PORTELLA et al., 2017). Embora os equídeos tendam a ser mais resistentes a infecção por *T. gondii* do que outras espécies domésticas (DUBEY; JONES, 2008; DUBEY, 2010), a associação da infecção com quadros de mieloencefalite nestes animais já foi descrita (JAMES et al., 2017), bem como a viabilidade do parasito, em cérebro e coração destes animais destinados ao consumo humano (EVERS et al., 2013; PASTIU et al., 2015; KLUN et al., 2017).

A carne equina tem na União Europeia e países asiáticos os principais consumidores (STANCIU, 2015), que por questões culturais têm o hábito de consumi-la crua ou mal-cozida, aumentando a chance de infecção por *T. gondii* (POMARES et al., 2011; STANCIU, 2015). Por isso torna-se importante estudos de prevalência e isolamento em países exportadores (EVERS et al., 2013; KLUN et al., 2017), como o Brasil, que abateu no período de 2008 a 2017 369.243 equídeos (MAPA, 2018), para atender a este mercado.

Neste contexto a identificação de DNA do parasito em carne equina exposta em supermercados (AROSSI et al., 2015) e o relato de toxoplasmose clínica em pessoas que consumiram carne equina crua ou mal passada (ELBEZ RUBINSTEIN et al., 2009; POMARES et al., 2011) demonstram a possibilidade desta via de infecção para a população humana. Embora haja relatos de

isolamento do parasito no cérebro e coração de equinos abatidos para consumo (EVERS et al., 2013; PASTIU et al., 2015; KLUN et al., 2017), e em *pool* de tecidos (SHAAPAN; GHAZY, 2007), não identificamos na literatura disponível a viabilidade do parasito a partir, apenas de musculatura esquelética de equídeos naturalmente infectados. Desta forma objetivou-se isolar *T. gondii* no cérebro e masseter de equídeos soropositivos, destinados ao abate oriundos de um matadouro-frigorífico no Sul do Brasil.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta de sangue e tecido.

O estudo foi realizado em um frigorífico sob Inspeção Federal localizado no estado do Rio Grande do Sul, no Sul do Brasil, e que recebe animais de todo o estado. As amostras foram coletadas em julho de 2016 e março de 2017. Foram coletados, em tubos sem anticoagulante, 10 mL de sangue em 354 equídeos (351 equinos e 3 muares). Paralelamente foi possível também a colheita de amostras de cérebro, masseter, fígado e coração de 319, 319, 52 e 41 animais, respectivamente.

A região occipital do crânio dos equídeos foi identificada com o número do animal e desta forma, as amostras de cérebro e masseter puderam ser pareadas com a sorologia de cada animal, porém não foi possível parear as amostras de coração e fígado. Os fragmentos das amostras colhidas pesavam, aproximadamente, de 8 a 12 gramas. Os tecidos foram seccionados com lâminas de bisturi estéril, sendo descartada após cada procedimento, e colocados individualmente em tubos estéreis tipo falcon de 50 mL com solução salina fosfatada tamponada (PBS), contendo penicilina benzatina (1000 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL).

Todas as amostras foram mantidas em refrigeração até o seu processamento. O sangue foi centrifugado a 1000g e o soro de cada amostra foi aliquoteado e acondicionado em tubos tipo *ependorf* de 2,0mL, identificados e armazenados a -20°C, para a sorologia. Os tecidos foram homogeneizados e tiveram fragmentos individualmente separados e armazenados em criotubos livre de DNase e RNase identificados e acondicionados a -20° C, para realização

das PCRs. O restante dos tecidos foi mantido em PBS, sob refrigeração até o resultado da sorologia para a seleção das amostras para o bioensaio. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC) - Protocolo nº020/13.

4.2.2. Reação de imunofluorescência indireta para *Toxoplasma gondii*

Para realização da sorologia para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* foi utilizada reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com ponto de corte na diluição de 1:64 para os equídeos e 1:16 para os camundongos (EVERS et al., 2013). As lâminas foram sensibilizadas com taquizoítos da cepa RH, sendo utilizado o conjugado anti-IgG equino (Sigma, F7759) e o conjugado anti-mouse (Sigma, F0257). A leitura das reações foi realizada em microscópio de epifluorescência com aumento de 400X, considerando-se como positiva a reação, em que mais de 50% dos taquizoítos apresentarem fluorescência periférica total. Os controles positivos e negativos foram provenientes do laboratório de parasitoses da Universidade Federal da Bahia. As amostras positivas foram posteriormente tituladas em diluições seriadas.

4.2.3. Ensaio Biológico para *Toxoplasma gondii*

O cérebro e o masseter de 20 equinos soropositivos para *T. gondii*, com titulações que variaram desde 64 a 512 foram submetidos ao processo de digestão péptica conforme descrito por Dubey (1998b). Em 7 equinos, 1 mL do produto da digestão do cérebro e 1 mL do masseter foram inoculados individualmente em dois camundongos por órgão (um pela via subcutânea e um pela via intraperitoneal), totalizando 28 camundongos. Nas amostras de 11 equinos, 1mL do produto da digestão do cérebro e 1 mL do masseter foram inoculados individualmente em camundongos apenas pela via subcutânea (um camundongo por órgão), totalizando 22 camundongos. Dois equinos soropositivos tiveram o pool do produto da digestão dos seus cérebros e masseteres inoculados (1mL) individualmente em 2 camundongos pela via intraperitoneal. Todas as amostras foram reinoculadas (+1mL), pela mesma via,

após 24 horas da primeira inoculação. Todos os camundongos sobreviveram durante o período do experimento, e foram eutanasiados e necropsiados 60 dias após inoculação.

4.2.4. Coleta de tecido e sangue dos camundongos

Durante a necropsia dos camundongos, houve a realização da coleta de sangue pela via intracardíaca para a realização da sorologia e a coleta de fragmentos de coração, baço, pulmão, cérebro e fígado que foram postos em frascos contendo formalina tamponada à 10% para a realização da histopatologia, e em criotubos livre de DNase e RNase acondicionados a -20° C, para realização das PCR.

4.2.5. Histopatologia

Amostras de cada tecido fixadas em formalina tamponada 10% foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina, com obtenção de cortes histológicos com 4-5 µm de espessura, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina e montados com auxílio de bálsamo do Canadá e lamínula histológica.

4.2.6. Extração do DNA

Para extração do DNA foram selecionadas as amostras de cérebro e masseter de 82,8% (264/319) dos equídeos em que foi possível coletar tecidos. Além destes, todos os fígados e corações coletados dos equídeos, bem como todos os órgãos coletados dos camundongos e os seus inóculos também foram submetidos à extração de DNA. Utilizou-se o EasyDna Kit da invitrogen™, seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras de DNA foram acondicionadas a -20°C até a realização das PCR.

4.2.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional

Para a amplificação do DNA de *T. gondii* foram utilizados os *primers* Tox4 (5CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3) e Tox5 (5CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3), que amplificam um fragmento de 529 bp, que se apresenta repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* (HOMAN et al., 2000). Cada reação foi realizada utilizando 5µL do DNA *template* e acrescido de 20 µL de um mix contendo 0,6 µM de cada *primer*, 100 µM de cada dNTP, Tampão 10x (Rxn buffer MgCl₂), 1,25 mM MgCl₂ e 1,25U Taq DNA polimerase. A amplificação do DNA do parasito foi feita em um termociclador (Biocycler MJ96G), e as condições termocíclicas foram desnaturação inicial de 7 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto e meio a 56°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33111) e gravados digitalmente por LPixImage-Loccus Biotecnologia. Como controle positivo foi utilizado DNA de taquizoítos de *T.gondii* da cepa RH oriundos de cultivo celular do laboratório de Parasitoses da Universidade Federal da Bahia, e como controle negativo utilizou-se água ultra-pura.

4.2.8. Nested PCR para detecção molecular de *T. gondii*

Para detecção do DNA de *T.gondii* foi realizada uma *nested*-PCR utilizando os *primers* Tg1 (5TGTTCTGTCCTATCGCAACG3) e o Tg2 (5ACGGATGCAGTTCCTTTCTG3) como *primers* externos e o Tg3 (5TCTTCCCAGACGTGGATTTTC3) e Tg4 (5CTCGACAATACGCTGCTTGA3) como *primers* internos, com um produto final de 531 pares de base do gene B1 (HABIB et al., 2012), como controle positivo foi utilizado DNA de taquizoítos de *T.gondii* da cepa RH, e como controle negativo utilizou-se água ultra-pura. As reações de amplificação com os *primers* externos foram realizadas utilizando 5µL do DNA *template* acrescido de 20 µL de um mix contendo 0,6 µM de cada *primer*, 100 µM de cada dNTP, Tampão 10x (Rxn buffer MgCl₂), 1,25 mM MgCl₂

e 1,25U Taq DNA polimerase, completando o volume com água destilada. As reações de amplificação com os *primers* internos foram realizadas utilizando 2µL do produto da primeira reação, acrescido de 23 µL de um mix contendo 0,6 µM de cada *primer*, 100 µM de cada dNTP, Tampão 10x (Rxn buffer MgCl₂), 1,25 mM MgCl₂ e 1,25U Taq DNA polimerase, completando o volume com água destilada ultrapura. As amplificações foram processadas em um termociclador BioCicler MJ96G com 35 ciclos programados para desnaturação (94°C/ 30 segundos), anelamento (48°C/ 45 segundos) e extensão (72°C/ 45 segundos); as reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos (KALAMBHE et al., 2017).

Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Syber safe e gravados digitalmente por LPixImage-Loccus Biotecnologia.

4.2.9. PCR para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Para verificar a integridade do DNA e a ausência de potenciais inibidores, submetemos amostras negativas à PCR para o gene da enzima GAPDH, que amplifica um produto de 400pb. A reação com volume final de 25µL foi composta por 10x de tampão de PCR; 2,0mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 1µM de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase e 5µL de DNA *template* (BIRKENHEUER et al., 2003). As amplificações foram processadas em um termociclador BioCicler MJ96G com 40 ciclos programados para desnaturação (94°C/ 30 segundos), anelamento (52°C/ 60 segundos) e extensão (72°C/ 60 segundos); as reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos (LACERDA et al., 2017).

4.2.10. PCR em tempo Real (q-PCR)

Nas amostras de cérebro dos camundongos, que soroconverteram após a inoculação (tabela 1), realizou-se uma qPCR, com objetivo de quantificar o DNA

do parasito. As ampliações foram realizadas contendo 0,5 µL de cada primer a 0,5µM (5'AGAGACACCGGAATGCGATCT3' e 5'CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3) (LÉLU et al., 2012), 10 µL de SYBR® Select Master Mix (AppliedBiosystems), 5µL de DNA a 20ng/µL, completando um volume final de 20 µL com água ultra-pura estéril livre de DNase e RNase. A qPCR foi realizada na plataforma AB 7500 *fast* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). A corrida utilizou um ciclo (95°C por 20 s) e 40 ciclos (95°C por 03 s, 60°C por 30 s). A curva de dissociação (melting curve) consistiu de um ciclo de 95° C por 15 s (rampa de 1,6°C/s), 60°C por 1 min (rampa de 1,6°C/s), 95°C por 15 s (rampa de 0,15°C/s). Para determinar o número de cópias do DNA das amostras, foi realizada uma curva padrão com 5 pontos a partir do DNA extraído de taquizoitos da cepa RH, contendo 5000, 500 ,50, 5 e 1 taquizoito(s).

4.2.11. Sequenciamento

Amostras positivas na *nested*-PCR foram selecionadas para a realização de um novo ensaio de PCR para o sequenciamento do mesmo. Os produtos da PCR foram purificados através do Purelink™ Quick gel extraction & PCR Purification combo Kit (Invitrogen™). Fragmentos purificados de DNA amplificados de amostras positivas foram submetidos ao método de eletroforese capilar (SANGER et al., 1977) em um analisador genético 3500xl (Applied biosystems). Os eletroferogramas gerados após o sequenciamento foram avaliados observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada, através do programa FinchTV (Geospiza research team), além disso os programas BioEdit v.7.0.5.3 (HALL, 2011) e BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foram usados para comparar as sequências obtidas com outras previamente depositadas no GenBank.

4.2.12. Análise estatística

Para avaliar o resultado da sorologia dos animais e a presença de DNA do parasito nos tecidos dos equídeos, utilizou-se a correlação de Spermann e o teste do Qui-quadrado, com correção de Yates. Os dados foram analisados no

Software Biostat, versão 4.0 (AYRES et al, 2005), considerando um nível de significância 95%.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Resultado dos equídeos

Foram soropositivos para *T. gondii* 19,2% (68/354) dos equídeos que compuseram o estudo. A titulação dos animais variou de 64 até 1024, com a seguinte distribuição: 38 (10,7%) animais com título 64, 19 (5,4%) com 128, 9 (2,5%) com 256, 1(0,3%) com 512 e 1(0,3%) com 1024.

Na PCR convencional nenhum dos tecidos de equinos foi positivo. Na *nested-PCR* 5,3%(14/264), dos equinos foram positivos para *T. gondii*, observando-se amplificação do DNA do parasito, em oito cérebros e em seis masseteres. Três destes equinos tiveram os títulos sorológicos iguais a 64, enquanto que os demais apresentaram títulos abaixo do ponto de corte (tabela 1). Além disso, um fígado e um coração foram positivos. Todas as amostras negativas nas PCRs foram positivas na PCR para o GAPDH.

4.3.2. Resultado dos camundongos

Um total de 28,8% (15/52) dos camundongos, que receberam inóculos oriundos de 12 equinos foram positivos para *T. gondii*. Destes camundongos, 7,7% (4/52) foram positivos apenas na *nested-PCR* (figura 1), 5,8% (3/52) foram positivos apenas na sorologia, com títulos variando de 32 a 256, enquanto 15,4% (8/52) dos camundongos foram positivos tanto na sorologia, quanto na *nested-PCR* (tabela 4). Os tecidos positivos no bioensaio foram três masseteres, 11 cérebros e um *pool* de masseter mais cérebro. Dos camundongos positivos na *nested PCR*, oito tiveram o cérebro positivo, dois o coração, um o fígado e o outro os pulmões positivos (tabela 4). Não foi observado cisto nos tecidos dos camundongos e nem amplificação do DNA do parasito na PCR convencional.

Na curva padrão, para qPCR foram observados para 5000, 500, 50, 5 e 1 taquizoítos os seguintes valores de Cts, respectivamente: 21,95; 25,82; 29,57; 33,65 e 35,23 com $R^2= 0,996$. Foi observado a presença de DNA amplificado do

parasito em todas as amostras de cérebro dos 11 camundongos que soroconverteram. Estes foram inoculados com amostras oriundas de oito equinos (oito de cérebro, dois de masséter e um pool de cérebro e masseter), com número de cópias variando de 29,90 a 34,84 (tabela 5). Todas as amostras negativas nas PCRs, foram positivas no PCR GAPDH.

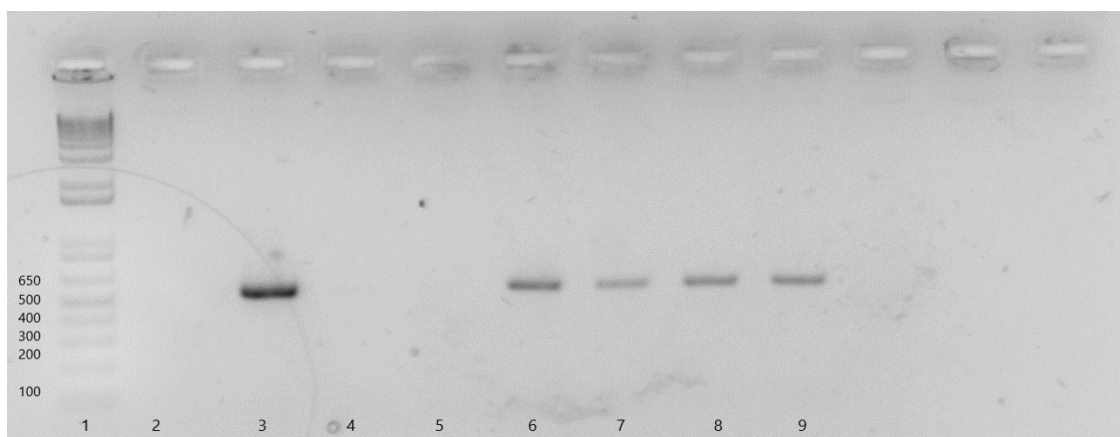


Figura 1. Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR em amostras de cérebro camundongos. Canaleta 1: Marcador de peso molecular; canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Controle positivo (531pb); Canaletas 4 e 5: amostras negativas; Canaletas 6 a 9: Amostras positivas.

4.3.3. Sequenciamento

Todas as sete amostras enviadas para o sequenciamento tiveram identidades variando de 99 a 100% para *T. gondii*.

4.3.4. Análise estatística

A correlação de Sperman ($r_s=-0.02$; $t=-0.31$) e o teste do Qui-quadrado ($X^2=0.1$; $p=0.75$) não demonstraram correlação ou associação significativa entre o resultado da sorologia e da *nested*-PCR dos tecidos dos equinos.

4.4. DISCUSSÃO

Sorologia positiva para *T. gondii* em equídeos destinados ao abate tem sido descrita nos países exportadores de carne desses animais (VIDOTTO et al.,

1997; EVERS et al., 2013; PAPINI et al., 2015; PASTIU et al., 2015; PORTELLA et al., 2017; PENA et al., 2018), demonstrando a exposição de equídeos aos oocistos presentes no ambiente, entretanto, o uso de diferentes técnicas sorológicas e pontos de corte, associado a ausência de um “padrão ouro” na sorologia para diagnóstico da toxoplasmose em equinos, dificulta a comparação, concordância e a performance entre os testes sorológicos e, por conseguinte, das prevalências encontradas (DUBEY et al., 1999a, AROUSSI et al., 2015).

Uma vez infectados, os equinos podem permanecer positivos por mais de 450 dias (DUBEY, 1985). Neste estudo a detecção molecular do parasito ocorreu apenas com o uso da *nested*-PCR e qPCR. A qPCR evidenciou uma carga parasitária muito baixa, o que pode justificar a ausência de amostras positivas na PCR convencional e a visualização de cistos teciduais.

A ausência de detecção molecular do parasito no tecido de equinos pela PCR convencional, também foi identificada em outros estudos (PASTIU et al., 2015) e, quando presente, os resultados mostram uma baixa positividade (EVERS et al. 2013), sugerindo uma ausência ou baixa carga parasitária (PAPINI et al., 2015), provavelmente devido a resistência dos equinos ao agente (DUBEY, 2010), levando a uma baixa parasitemia e distribuição não uniforme do parasito nos tecidos (OPSTEEGH et al., 2011; AROUSSI et al., 2015; OPSTEEGH et al., 2016). Fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis (AROUSSI et al., 2015; PAPINI et al., 2015) ou o uso do bioensaio para detecção do parasito (EVERS et al., 2013; PASTIU et al., 2015), como utilizado neste trabalho.

Foi utilizada a sorologia positiva dos animais como critério de escolha para o bioensaio e com êxito no isolamento em equinos com títulos de anticorpos que variaram de 64 a 512. Pastiu et al., (2015) selecionaram 10 equinos com a maior sorologia no ELISA, obtendo o isolado de apenas dois deste animais, Klun et al. (2017) obtiveram o isolamento em um equino com baixo título de anticorpos e outro negativo, enquanto (EVERS et al., 2013) obtiveram isolamento através de equinos soronegativos. Gennari et al., (2015) selecionaram 10 equídeos soropositivos e 50 equídeos soronegativos (divididos em 10 grupos de 5) para o bioensaio e, obtiveram apenas um isolado, de um muar soropositivo. PENA et al., (2018) selecionaram 13 equídeos soropositivos, e obtiveram também um isolado. Aroussi et al. (2015) observaram em seu estudo a ausência de

correlação entre o resultado da sorologia e a presença do parasito nos tecidos, concluindo que a sorologia não parece ser um método adequado para prever o risco da infecção para equinos. Nossos resultados corroboram parcialmente, pois, embora tenhamos encontrado uma fraca correlação, isolamos o parasito através do bioensaio, de animais com sorologia positiva, porém negativos na *nested-PCR*, o que apenas reforça a pequena carga parasitária nos tecidos dos animais positivos no bioensaio. Ainda sobre este ponto, neste estudo foi possível detectar DNA amplificável do parasito em 5,55% (11/198) dos animais com sorologia negativa, reforçando o resultado da fraca correlação. A sorologia foi refeita em 11 animais, e em 10 encontramos títulos variando de 8 até 32, enquanto um não apresentou título detectável (tabela 1), confirmando a dificuldade em se estabelecer uma relação entre sorologia e detecção do parasito nos tecidos (OPSTEEGH et al., 2016). A identificação de DNA do parasito em amostras de masséteres de seis animais soronegativos (no ponto de corte selecionado) demonstra a possibilidade de transmissão mesmo em animais soronegativos.

Isolados de *T. gondii*, oriundos de amostras de cérebro e coração, de equinos destinados ao consumo humano, já foram relatadas (EVERS et al., 2013; PASTIU et al., 2015; KLUN et al., 2017; PENA et al., 2018). Segundo Lindsay et al (1995), a infecção por *T. gondii* na musculatura cardíaca é mais frequente e clinicamente mais importante, que na musculatura esquelética, enquanto que o SNC é um sítio de predileção do parasito (DUBEY, 1997). Entretanto, embora sejam importantes para o isolamento, a identificação do parasito nestes locais (cérebro e coração) não fornece subsídios para caracterizar a importância epidemiológica de transmissão do parasito em humanos, em virtude do consumo de carne equina.

Foi possível encontrar DNA amplificado do parasito no masseter de alguns equinos, bem como em camundongos inoculados com este tecido. Na União europeia há o hábito de comer carne equina crua (POMARES et al., 2011), sendo o masseter uma das partes do equino utilizada na alimentação humana (MARTUZZI et al., 2001), o que torna um achado importante, para a saúde pública, visto o mercado consumidor crescente em vários países da Europa e Ásia (STANCIU, 2015). Este resultado reforça o fato que o hábito do consumo da carne equina mal passada ou crua, pela população humana torna a mesma

susceptível a adquirir a infecção (POMARES et al., 2011; ELBEZ RUBINSTEIN et al., 2009).

Não foi possível realizar as PCRs antes da seleção das amostras para o bioensaio e nem tínhamos camundongos a disposição para realizar o mesmo em todas as amostras dos equídeos, o que poderia aumentar o número de isolados obtidos. Neste estudo foi utilizado um tempo máximo de 4 dias, entre a coleta e o bioensaio, diferentemente de Aroussi et al. (2015) que não teve como determinar o tempo entre o abate dos animais e o bioensaio, o que pode em parte justificar a ausência de parasitos viáveis, mas com DNA amplificável nas amostras de carne utilizadas no seu estudo.

Infelizmente em virtude da pequena concentração de DNA nas amostras não foi possível a realização da genotipagem, como ocorrido também com Evers et al. (2013), que não conseguiram amplificação em todos marcadores da PCR-RFLP. Uma vez que a toxoplasmose congênita em humanos já foi confirmada em um caso de reinfecção envolvendo diferentes genótipos de *T. gondii* (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009), um cuidado especial deve ser dado a fim de inativar formas do parasito que possam estar presentes em carnes de equinos abatidos em regiões com grande variabilidade genética do mesmo, como a América do Sul, e importados, para consumo humano, por países de locais onde esta variabilidade é baixa, como a Europa (SHWAB et al., 2013), uma vez que parte desta carne é enviada fresca ou refrigerada e tradicionalmente são ingeridas cruas (POMARES et al., 2011).

4.5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitem concluir que embora haja uma carga parasitária baixa no tecido, a identificação de DNA e o isolamento do agente no masseter dos equinos reforça a possibilidade do risco da infecção por *T. gondii* através do consumo para a população humana.

Tabela 4. Resultado da sorologia, *nested*-PCR e da PCR em tempo real para *Toxoplasma gondii*, nos camundongos e equídeos positivos

Animal ¹	Titulação ²		Via de inoculação	Orgão Inoculado	<i>Nested</i> PCR Camudongo	<i>Nested</i> PCR Equino
	Equino	Camundongo				
166	128	32	IP	Cerebro	+ (cer)	-
176	256	64	SC	Masseter	+ (cer)	-
176	256	32	SC	Cérebro	-	-
176	256	128	IP	Cérebro	+ (cer)	-
319	128	64	IP	Cérebro	+ (cer)	-
319	128	128	SC	Cérebro	-	-
257	64	128	SC	Masseter	+ (cer)	-
292	512	64	SC	Cérebro	+ (cer)	-
230	128	256	SC	Cérebro	+ (cer)	-
261	64	32	SC	Cérebro	+ (cor)	-
119	64	64	IP	Cérebro+ masseter	-	-
120	256	-	SC	Cérebro	+ (pul)	-
251	256	-	SC	Cérebro	+ (fig)	-
078	256	-	SC	Masseter	+ (cor)	-
238	64	-	SC	Cérebro	+ (cer)	+ (cer)
220	64	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
239	64	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
249	<64 (16)	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
279	<64 (32)	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
011	<64 (8)	NB	NB	NB	NB	+(mas)
097	<64 (8)	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
102	<64 (16)	NB	NB	NB	NB	+(mas)
086	<64 (8)	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
107	<64 (32)	NB	NB	NB	NB	+ (cer)
022	<64 (32)	NB	NB	NB	NB	+(mas)
168	<64 (32)	NB	NB	NB	NB	+(mas)
072	<64 (8)	NB	NB	NB	NB	+(mas)
084	<64 (-)	NB	NB	NB	NB	+(mas)

1= Identificação do animal; 2 =Titulação de anticorpos pela reação de imunofluorescência indireta; - negativo; NB: Não houve bioensaio; IP= Intraperitoneal; SC= Subcutâneo

Tabela 5. Resultado da quantificação de taquizoítos nos camundongos soropositivos na RIFI através da PCR em tempo real

ID ¹	166	176	176	176	319	319	257	292	230	261	119
Q-taq ²	3.52	12.8	3.3	1.9	6.1	19.2	39.8	11.2	4.2	2.8	7.6
Ct ³	33.8	31.7	33.9	34.8	32.9	31.1	29.9	32.0	33.9	34.2	32.7

¹ID= Identificação; ²Q-taq= quantificação dos taquizoítos³ Ct= valor do limite do ciclo da amostra

5.0. 2 CAPÍTULO

DETECÇÃO E ESTRUTURAÇÃO MOLECULAR DE CISTOS DE *SARCOCYSTIS BERTRAMI* EM MUSCULATURA DE EQUÍDEOS ABATIDOS EM UM FRIGORÍFICO NO SUL DO BRASIL.

5.1. INTRODUÇÃO

Sarcocystis sp. é um parasito com ciclo heteroxeno obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, com distribuição cosmopolita (FAYER et al., 2015). *Sarcocystis fayeri* e *S. bertrami* possuem os cães como hospedeiros definitivos. Estes parasitos podem ser encontrados na forma de cistos na musculatura esquelética, esôfago, coração, diafragma e língua dos equídeos (DUBEY et al., 1977; HINAIDY; LOUPAL, 1982; EDWARDS, 1984; KIRMSE, 1986; HILALI, 1987). Outras espécies de *Sarcocystis* como *S. equicanis* (ROMMEL; GEISEL, 1975) e *S. asinus* (GADAEV, 1978) também foram relatados em equídeos, no entanto, as regras de nomenclatura zoológica enquadram estas espécies como sinonímia de *S. bertrami* (LEVINE; TADROS, 1980; ODENING, 1998; DUBEY et al., 2015).

Equídeos se mostram bastante susceptíveis à infecção por *S. fayeri* e *S. bertrami*. Estudos experimentais nos equídeos infectados observaram pirexia e anemia leve (FAYER; DUBEY et al., 1982). Enquanto que em estudos em condições naturais foram observados fraqueza muscular, ataxia, perda de peso (CAWTHORN et al., 1990), granulomatose (HERD et al., 2015), atrofia muscular, déficit de marcha e disfagia (ALEMAN et al., 2016).

Estudos na Ásia, Europa e África demonstram uma elevada prevalência de *Sarcocystis* sp. em equídeos através da visualização microscópica dos cistos em seus tecidos (HINAIDY; LOUPAL, 1982; EDWARDS, 1984; HILALI; NASSAR, 1987; FUKUYO et al., 2002). Através da PCR foi identificado *S. fayeri* na musculatura de equídeos nos Estados Unidos, no sangue de um jumento na Zâmbia e em carnes de supermercado no Japão (ALEMAN et al., 2016; COULTOUS et al., 2017; MURATA et al., 2018).

Relatos de pessoas no Japão que apresentaram náusea, vômitos e diarreia associadas ao consumo da carne crua ou mal passada de cavalo infectada por *S. fayeri*, já foram descritas (HARADA et al., 2013; MURATA et al., 2018). Este potencial de *S. fayeri* está relacionado a presença de uma fração protéica do parasito que pode agir como toxina (KAMATA et al., 2014; IRIKURA et al., 2017). Esta informação torna-se importante na medida em que existem relatos de equídeos positivos para *Sarcocystis* oriundos de frigoríficos (FUKUYO et al., 2002; PORTELLA et al., 2017), o que reforçam medidas preventivas como

o congelamento da carne para prevenir casos de intoxicação (HARADA et al., 2013).

Objetivou-se identificar microscopicamente e caracterizar geneticamente *Sarcocystis* sp. em masseteres e coração de equídeos destinados ao consumo humano em um frigorífico no Sul do Brasil.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Coleta de tecido.

O estudo foi realizado em um frigorífico sob Inspeção Federal localizado no Estado do Rio Grande do Sul, no Sul do Brasil, e que recebe animais de todo o estado. As amostras foram coletadas em julho de 2016 e março de 2017. Após o abate dos equídeos, destes 316 equinos e 3 muares, foram coletadas amostras de masseter e coração de 319 e 41 animais, respectivamente.

Os fragmentos das amostras colhidas pesavam, aproximadamente, de 8 a 12 gramas. Os tecidos eram seccionados com lâminas de bisturi estéril, sendo descartada após cada procedimento, e separados individualmente em tubos estéreis tipo falcon de 50 mL com solução salina fosfatada tamponada (PBS), contendo penicilina benzatina (1000 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), em uma área próxima, no mesmo tecido, foi realizada outra secção para outr/o falcon de 15mL com formol tamponado (10%). Todas as amostras foram mantidas em refrigeração até o seu processamento. Os tecidos tiveram fragmentos individualmente separados e armazenados em criotubos livre de DNase e RNase identificados e acondicionados a -20º, para realização das PCRs. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UDESC) - Protocolo nº020/13.

5.2.2. Histopatologia

Amostras de cada tecido fixadas em formalinada tamponada 10% foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina, com obtenção de cortes histológicos com 4-5 µm de espessura, os quais foram

corados pela técnica de hematoxilina-eosina e montados com auxílio de bálsamo do Canadá e lamínula histológica.

Durante a leitura os cistos foram visualizados e classificados em 6 classes: I= redondo com parede grossa; II= redondo com parede fina; III= elíptico com parede grossa; IV: Elíptico com parede fina; V: Colunar com parede grossa; VI: colunar com parede fina. Além disso 4 cistos de cada classe foram selecionados e tiveram as suas paredes mensuradas em μm . As imagens foram capturadas e mensuradas através de uma câmera acoplada no microscópio Olympus BX51, com o auxílio do programa Image Pro-Express 6.0.

5.2.3. Extração do DNA

As amostras dos masseteres, e dos corações coletados dos equídeos foram submetidas a extração de DNA utilizando o EasyDna Kit da invitrogen™ ou®, seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente as amostras foram acondicionadas a -20°C até a realização das PCRs. Para extração do DNA foram selecionadas as amostras de masseter de 82,75% dos equídeos (264/319), sendo incluídas todas as amostras em que foram visualizadas cistos de coccídios na histopatologia.

5.2.4. Reação em cadeia da polimerase

Para detecção do DNA de *Sarcocystis* sp. foi realizada uma *nested* PCR utilizando os primers S4 (5TATCCCCATCACGATGCATAC3) e S5 (5TTTCGATTCCGGAGAGGGAGC3) como primers externos e o S2 (5TGATCGTCTTCGAGCCCCTA3) e S7 (5GTAATTCCAGCTCCAATAGCG3) como primers internos, para a amplificação do gene 18S rRNA (FISCHER et al., 1998). Como controle positivo, foi utilizado DNA de merozoíto de *Sarcocystis neurona* da cepa SN138 oriundo de cultivo celular do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Universidade Federal da Bahia, e como controle negativo, utilizou-se água ultra-pura. As reações de amplificação com os primers externos foram realizadas utilizando 5 μL do DNA template e acrescido de 20 μL de um mix contendo 0,8 μM de cada primer, 100 μM de cada dNTP, Tampão 10x (Rxn buffer MgCl_2), 2,5 mM MgCl_2 e 1,25U Taq DNA polimerase,

completando o volume com água destilada. As reações de amplificação com os primers internos foram realizadas utilizando 2µL do amplicon oriundo da primeira reação e acrescido de 22 µL de um mix contendo 0,8 µM de cada primer, 100 µM de cada dNTP, Tampão 10x (Rxn buffer MgCl₂), 2,5 mM MgCl₂ e 1,25U Taq DNA polimerase, completando o volume com água destilada ultrapura. As amplificações foram processadas em um termociclador BioCicler MJ96G com 35 ciclos programados para desnaturação (94°C/ 40 segundos), anelamento (48°C/ 40 segundos) e extensão (72°C/ 90 segundos), as reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguido de uma extensão final de 72°C por 4 minutos (ALEMAN et al., 2016). Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Syber safe e gravados digitalmente por LPix Image-Loccus Biotecnologia.

5.2.5. PCR para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Para verificar a integridade do DNA e a ausência de potenciais inibidores, submetemos amostras negativas à PCR para o gene da enzima GAPDH, que amplifica um produto de 400pb. A reação com volume final de 25µL foi composta por 10x de tampão de PCR; 2,0mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 1µM de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase e 5µL de DNA template (BIRKENHEUER et al., 2003). As amplificações foram processadas em um termociclador BioCicler MJ96G com 40 ciclos programados para desnaturação (94°C/ 30 segundos), anelamento (52°C/ 60 segundos) e extensão (72°C/ 60 segundos); as reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos (LACERDA et al., 2017).

5.2.6. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados através do Purelink™Quick gel extraction & PCR Purification combo Kit (Invitrogen) e submetidos submetidas ao método de eletroforese capilar (SANGER et al., 1977) em um analisador

genético 3500xl (Applied biosystems). Os eletroferogramas gerados após o sequenciamento foram avaliados observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada, através do programa FinchTV (Geospiza research team), além disso os programas Bio Edit v.7.0.5.3 (HALL, 1999) e BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foram usados para comparar as seqüências obtidas com outras previamente depositadas no GenBank.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. PCR e Histopatologia

Foi observada a amplificação de *Sarcocystis* sp. na PCR (figura 2), de um total de 33,7% (89/264) equinos e uma amostra positiva para muar. Destas amostras positivas na PCR em 63,8% (37/58) foram visualizados cistos de coccidios através da histopatologia (figura 3), sendo 36 em equinos e em um muar. No entanto, 21 amostras que tiveram cistos visualizados não foram positivas na PCR. Todas as amostras de coração foram negativas na PCR e histopatologia.

O cisto tipo II foi o mais visualizado, enquanto que o cisto tipo VI foi o menos visualizado, tabela 6. Em 24 amostras foram visualizadas associação de dois ou mais tipos de cistos. Todos os cistos visualizados tinham características de septação no seu interior. A espessura da parede dos cistos variaram de 0,64 a 2,13 μm , tabela 6.

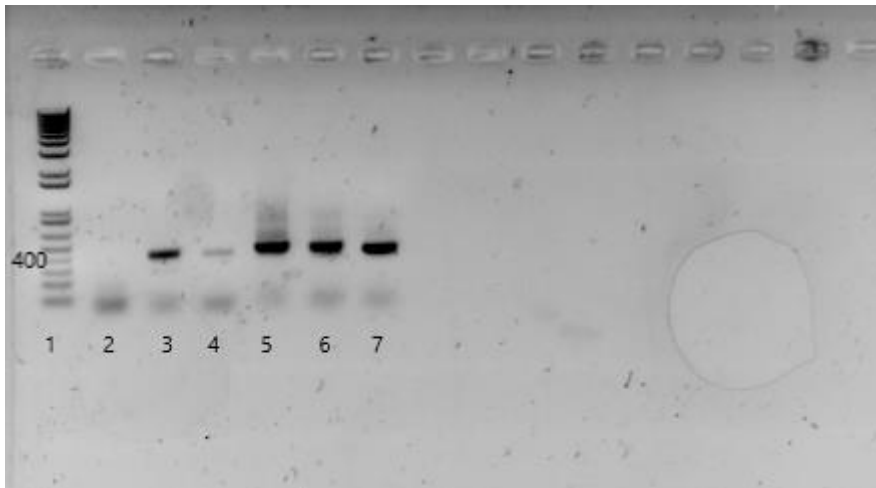


Figura 2. Detecção de DNA de *Sarcocystis* sp. pela PCR em amostras de masseter de equinos destinados ao consumo humano. Canaleta 1: Marcador de peso molecular; canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Controle positivo ($\cong 400\text{pb}$); Canaletas 4 a 7: amostras positivas.

5.3.2. Sequenciamento

Em 12 amostras positivas na PCR, 11 com visualização do cisto na histopatologia, foram selecionadas para o sequenciamento, estas amostras tiveram a variação da identidade de 89 a 97% para *S. bertrami* e 89 a 98% para *S. fayeri*, tabela 7.

5.4. DISCUSSÃO

Este estudo identificou amostras de masseter positivas na *nested* PCR e histopatologia para *Sarcocystis* sp. em equídeos destinados ao abate, o que confirma a presença de *Sarcocystis* na musculatura de equídeos no Brasil. O que confirma a exposição destes animais a esporocistos presentes no ambiente e, sinaliza para a possibilidade de intoxicação em seres humanos, pela ingestão da carne crua ou mal passada dos equídeos (DUBEY, 1977; KAMATA et al., 2014).

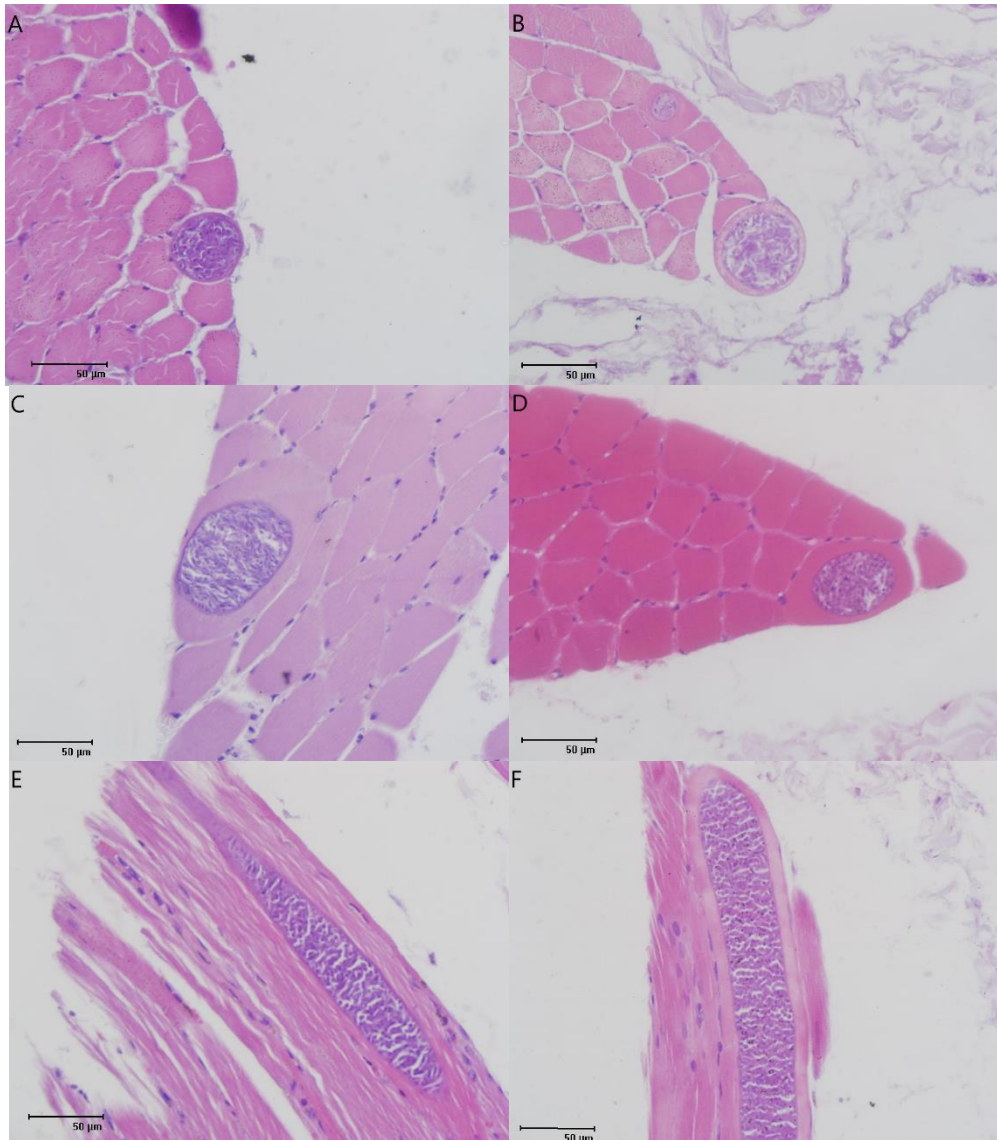


Figura 3. Cistos de coccídios em masseter positivos para *Sarcocystis* sp. na nested PCR. Aumento de 400X. A. Cisto redondo da parede grossa; B. Cisto redondo da parede fina; C. Cisto elíptico da parede grossa; D. Cisto elíptico da parede fina. E. Cisto colunar da parede grossa; F. Cisto colunar da parede fina.

Tabela 6. Tipo de cistos encontrados em amostras de masseter de equídeos abatidos em um frigorífico no sul do Brasil

TC	TCVA	VPC (µm)
I	17	1,24-1,30
II	24	0,64-0,92
III	20	1,43-2,00
IV	21	0,89-0,99
V	09	1,73-2,13
VI	06	0,70-0,89
AC	24	-

TC: Tipo de cisto; AC: Associação de 2 ou mais cistos; TCVA= Tipo de Cisto visualizado nas amostras; VPC (µm)= Variação da parede dos cistos em µm.

Tabela 7. Resultado do sequenciamento de 12 amostras de masseter positivas para *Sarcocystis* sp. de equídeos abatidos em um frigorífico no sul do Brasil

Amostra	% ID <i>S. bertrami</i>	%ID <i>S. fayeri</i>	TC
016	89	89	III e IV
213	91	91	II, IV e V
223	90	90	I e II
225	93	93	I, II e IV
251	92	92	II, III e V
139	91	91	II e IV
120	89	89	I e II
069	97	98	0
241	95	95	I
084	93	94	I, III, IV e V
086	93	94	I, II e III
072	92	93	III

%ID= porcentagem da identidade; TC= Tipo de cisto; 0= não teve cisto visualizado.

Amostras positivas para *Sarcocystis* em equídeos foram visualizadas microscopicamente em esôfago, coração, útero, língua, diafragma e músculos da região escapular, abdominal e coxa (HILALI; NASSAR, 1987; FUKUYO et al., 2002; DUBEY et al., 2016; ZENG et al., 2018) e na língua através da microscopia eletrônica (DUBEY et al., 2016). As amostras de coração neste estudo foram negativas o que corrobora com estudos em equídeos realizados por Portella et al., (2017) e Zeng et al., (2018), entretanto, prevalências de cistos no coração já tiveram relatos de 90% em jumentos (HILALI; NASSAR, 1987) e 15% em equinos (FUKUYO et al., 2002). Outros estudos relatam prevalência de 97,5% na língua e 62,2% no esôfago (EDWARDS, 1984; FUKUYO et al., 2002). Diante disso, temos o primeiro relato de cisto de *Sarcocystis* sp. visualizado em masseter de equídeos, e confirmado através da *Nested* PCR e sequenciamento.

Esta informação é importante, em se tratando de saúde pública, já que o masseter de equídeos pode ser utilizado na alimentação humana (MARTUZZI et al., 2001). Pois existem relatos de intoxicação alimentar em humanos associados ao consumo de carne equina infectada com *S. fayeri* no Japão (HARADA et al., 2013; KAMATA et al., 2014; IRIKURA et al., 2017). O mercado consumidor de carne equina está presente principalmente em países europeus e asiáticos (STANCIU et al., 2015). O Brasil, um dos exportadores, abateu no período de 2008 a 2017 369.243 equídeos (MAPA, 2018), para atender a este mercado.

O grande número de associações de tipos de cistos encontradas dificultou uma associação molecular com a histopatologia, pois mesmo que um tipo de cisto tenha sido visualizado em uma determinada amostra, não descarta que esta amostra tenha outros tipos de cistos que possam ter tido seu DNA extraído em conjunto para a detecção molecular.

A espessura das paredes dos cistos neste estudo são semelhantes ao resultado obtido por outros estudos que encontraram cistos de *Sarcocystis* sp. em equídeos. Dubey et al., (1977) encontraram cistos de *S. fayeri* em amostras de esôfago e coração de equinos com variação de 1 a 2 µm. Hilali & Nassar (1987) ao analisarem cistos de *Sarcocystis* sp. em esôfago, coração e diafragma de jumentos, observaram que as paredes destes cistos variavam de 1 a 3 µm. Posteriormente Dubey et al., (2016) ao analisarem cistos de *S. bertrami* em língua de jumentos encontraram paredes de cistos que variavam de <1 a 5 µm.

Neste estudo foram encontradas amostras positivas para *Sarcocystis* com alta similaridade entre *S. fayeri* e *S. bertrami*. *S. fayeri* em tecidos de equídeos foram diagnosticados através de PCR, seguido de sequenciamento, nos Estados Unidos, Gambia e Japão (ALEMAN et al., 2016; COULTOUS et al., 2017; MURATA et al., 2018). No entanto, Dubey et al., (2016), através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) determinaram que a espécie em equídeos fosse chamada de *S. Bertrami*. Posteriormente, Zeng et al., (2018) ao analisarem amostras de equídeos através da MET e PCR também denominaram a espécie como *S. bertrami*, pois os mesmos acreditam que se trata da mesma espécie, sendo considerada *S. bertrami* por ser a primeira espécie relatada em equídeos (DUBEY et al., 2016; ZENG et al., 2018), devido a todo o exposto acreditamos também se tratar de *S. bertrami*.

5.5. CONCLUSÃO

Este estudo aborda o primeiro relato de cistos de *Sarcocystis* em equídeos com caracterização molecular na América do Sul, o que confirma o masseter como uma musculatura capaz de albergar cistos do parasito, e relatando, desta forma, a possibilidade de equídeos atuarem como reservatórios de *S. bertramii* no Brasil.

6.0. CAPÍTULO 3

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-SARCOCYSTIS SP., ANTI-NEOSPORA SP. E ANTI-BESNOITIA SP. EM EQUÍDEOS ORIUNDOS DE UM FRIGORÍFICO NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E BIOENSAIO EM GERBIS (*MERIONES UNGUICULATUS*) PARA *NEOSPORA*

6.1. INTRODUÇÃO

Equídeos são hospedeiros intermediários de coccídios como *Sarcocystis* sp., *Neospora* sp. e *Besnoitia* sp., que podem apresentar um curso de infecção assintomático ou desencadear alterações neurológicas, neuromusculares, dérmicas e oftálmicas (NESS et al., 2012ab; DUBEY et al.; 2015; ALEMAN et al., 2016; DUBEY et al., 2015).

Os equídeos podem se infectar por *Sarcocystis* sp. através da ingestão de oocistos ou esporocistos no ambiente, oriundos das fezes de gambás (*Didelphis* sp.) e cães (*Canis familiaris*) (DUBEY et al., 1977; 2001), enquanto para *N. caninum* os equídeos podem se infectar através de ingestão de oocistos eliminados por canídeos (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010, DUBEY et al., 2011), ou por transmissão vertical (PUSTERLA et al., 2014a). No entanto, os hospedeiros definitivos de *Neospora hughesi* e *Besnoitia bennetti* ainda não são conhecidos, e pouco se sabe sobre as formas de infecção (WOBESER et al., 2009; NESS et al., 2014).

Sarcocystis sp. é um parasito heteroxeno obrigatório, encontrado em várias partes do mundo (FAYER et al., 2015). Espécies identificadas no músculo de cavalos incluem *S. bertrami* e *S. fayeri* (DUBEY 1977; 2016; HINAIDY; LOUPAL, 1982; ZENG et al., 2018), enquanto que no tecido nervoso é encontrado o *S. neurona*, conhecido como o principal agente causador da mieloencefalite protozoária equina (EPM) (DUBEY et al., 2015). Estudos a respeito da forma de diagnóstico entre estas espécies já demonstraram que a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi considerada por alguns autores como forma segura no diagnóstico da EPM (DUARTE et al., 2003). No entanto, ainda existem dúvidas a respeito da possibilidade de reação cruzada entre estas espécies de *Sarcocystis* através da sorologia (GRANSTROM et al., 1993; SAVILLE et al. 2004).

Quanto ao gênero *Neospora*, apenas *N. hughesi* foi identificado como causador da EPM (REED et al., 2016). *Neospora caninum* é relatado em uma variedade de espécies animais, que atuam como hospedeiros intermediários no seu ciclo biológico (GONDIM 2006; DUBEY et al. 2007), enquanto que *N. hughesi* foi identificado apenas, até o momento, na espécie equina (MARSH et

al., 1998; WOBESER et al., 2009). Um Isolado de *Neospora* sp. foi obtido através de um equino imunodebilitado nos Estados Unidos (DUBEY et al., 2001).

Besnoítia bennetti é responsável pela Besnoitiose equina (DUBEY et al., 2005). Os sinais clínicos dessa doença são caracterizados por nódulos parasitários sobre a pele, rosto, corpo, interior das narinas e pernas de seus hospedeiros (DUBEY et al., 2005; NESS et al., 2012ab; 2014). Há relatos em equídeos na África do sul, Estados Unidos e Bélgica (SCHULZ; THORBURN, 1955; NESS et al., 2012a; LIENARD et al., 2018), no entanto até o momento não há registros de equídeos positivos para *B. bennetti* na América do Sul.

Objetivou-se determinar a frequência, através da sorologia de *Sarcocystis* sp., *Neospora* sp e *Besnoítia* sp. em equídeos destinados ao abate e a realização do bioensaio em gerbis na tentativa de isolamento para *Neospora* sp.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Coleta de sangue e tecido

O estudo foi realizado em um frigorífico sob Inspeção Federal localizado no Estado do Rio Grande do Sul, no Sul do Brasil, que recebe animais de todo o estado. As amostras foram coletadas em julho de 2016 e março de 2017. Foram coletados, em tubos sem anticoagulante, 10 mL de sangue em 354 equídeos (351 equinos e 3 muas). Paralelamente foi possível também a colheita de amostras de cérebro, masseter, fígado e coração de 319, 319, 52 e 41 animais, respectivamente.

A região occipital do crânio dos equídeos era identificada com o número do animal e desta forma, as amostras de cérebro e masseter puderam ser pareadas com a sorologia de cada animal, porém não foi possível parrear as amostras de coração e fígado. Os fragmentos das amostras colhidas pesavam, aproximadamente, de 8 a 12 gramas. Os tecidos eram seccionados com lâminas de bisturi estéril, sendo descartada após cada procedimento, e colocados individualmente em tubos estéreis tipo falcon de 50 mL com solução salina fosfatada tamponada (PBS), contendo penicilina benzatina (1000 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL).

Todas as amostras foram mantidas em refrigeração até o seu processamento. O sangue foi centrifugado a 1000g e o soro de cada amostra foi aliquoteado e acondicionado em tubos tipo eppendorf de 2,0mL, identificados e armazenados a -20°C, para a sorologia. Os tecidos tiveram fragmentos individualmente separados e armazenados em tubos tipo eppendorf livre de DNase e RNase identificados e acondicionados a -20°, para realização das PCRs. O restante dos tecidos foi mantido em refrigeração enquanto as provas sorológicas foram realizadas para a seleção das amostras que foram encaminhadas para o bioensaio. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC) - Protocolo nº020/13.

6.2.2. Reação de imunofluorescência indireta para *Besnoitia* sp, *Neospora* sp. e *Sarcocystis* sp.

Para realização da sorologia para pesquisa de anticorpos contra *Neospora* sp. foi utilizada reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerando como ponto de corte a diluição para equinos de 1:50 para *Neospora* sp. (VARDELEON et al., 2001), para *Sarcocystis* sp. foi utilizado o ponto de corte 1:80 (PUSTERLA et al., 2014b) e *Besnoitia* sp. 1:50 (DUBEY et al., 2005). As lâminas foram sensibilizadas com taquizoítos da cepa NC-Bahia (*N. caninum*) (GONDIM et al., 2001), Bb1évora03 (*B. besnoiti*) (CORTES et al., 2006) e SN138 (*S. neurona*) (LINDSAY et al., 2004), sendo utilizado o conjugado anti-IgG equino (Sigma, F7759). A leitura das reações foi realizada em microscópio de epifluorescência com aumento de 400X, considerando-se como positiva a reação, em que mais de 50% dos taquizoítos apresentarem fluorescência periférica total. Os controles positivos e negativos para *Neospora* sp. e *Sarcocystis* sp. foram provenientes do laboratório de parasitoses da Universidade Federal da Bahia, enquanto que os controles positivos e negativos para *Besnoitia* sp. foram provenientes do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) de Oeiras, Portugal. As amostras positivas foram, posteriormente, tituladas em diluições seriadas.

6.2.3. Western blotting para *Besnoita* sp.

As amostras que foram positivas na RIFI para *Besnoita* sp. foram testadas através da técnica do Western Blotting de acordo com Schares et al., (2010).

6.2.4. Ensaio Biológico para *Neospora* sp.

O *pool* do cérebro e masseter de nove equinos soropositivos para *Neospora* sp. foi submetido ao processo de digestão péptica conforme descrito por Dubey (1998b). Em nove equinos, 1 mL do produto da digestão do *pool* do cérebro e masseter foi inoculado individualmente em um gerbil pela via subcutânea, totalizando nove gerbis. Todas as amostras foram reinoculadas (+ 1mL), pela mesma via, após 24 horas da primeira inoculação. Todos os gerbis sobreviveram durante o período do experimento, e foram eutanasiados e necropsiados 60 dias após inoculação.

6.2.5. Coleta de tecido e sangue dos gerbis

Os gerbis foram eutanasiados e durante a necropsia houve a realização da coleta de sangue pela via intracardíaca e a coleta de fragmentos de coração, baço, pulmão, cérebro e fígado em frascos contendo formol (10%) para a realização da histopatologia. Os mesmos tecidos tiveram fragmentos individualmente separados e armazenados em criotubos livre de DNase e RNase, identificados e acondicionados a -20°, para realização das PCRs.

6.2.6. Sorologia dos gerbis

Para realização da sorologia de anticorpos contra *Neospora* sp. foi utilizada reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com ponto de corte na diluição de 1:25 (WALSH et al., 2000). As lâminas foram sensibilizadas com taquizoítos da cepa NC-BAHIA (GONDIM et al., 2001), sendo utilizado o conjugado anti-mouse (Sigma, F0257). A leitura das reações foi realizada em microscópio de epifluorescência com aumento de 400X, considerando-se como positiva a reação em que mais de 50% dos taquizoítos apresentarem fluorescência periférica total. Os controles positivos e negativos foram provenientes do laboratório de parasitoses da Universidade Federal da Bahia.

6.2.7. Histopatologia

Amostras de cada tecido fixadas em formalinada tamponada 10% foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina, com obtenção de cortes histológicos com 4-5 μm de espessura, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina e montados com auxílio de bálsamo do Canadá e lamínula histológica.

6.2.8. Extração do Ácido desoxirribonucleico (DNA)

As amostras dos masseteres, e dos corações coletados dos equídeos foram submetidas a extração de DNA utilizando o EasyDna Kit da invitrogen™ ou®, seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas a -20°C até a realização das PCRs. Para extração do DNA foram selecionadas as amostras de cérebro e masseter de 82,75% (264/319) dos equídeos deste estudo, dos quais foi possível coletar tecidos, incluindo todos os 33 animais soropositivos para *Neospora* sp.

6.2.9. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional

Para a amplificação do DNA de *Neospora* sp. foram utilizados os *primers* Np6 (5CAGTCAACCTACGTCTTCT3) e Np21 (5GTGCGTCCAATCCTGTAAC3) que amplificam um fragmento de 337 bp do gene NC5 (YAMAGE et al. 1996). Cada reação foi realizada utilizando 5 μL do DNA template e acrescido de 20 μL de um mix contendo 0,6 μM de cada primer, 100 μM de cada dNTP, Tampão 10x (Rxn buffer MgCl_2), 1,25 mM MgCl_2 e 1,25U Taq DNA polimerase. A amplificação do DNA do parasito foi feita em um termociclador (Biocycler MJ96G), e as condições termocíclicas foram: 40 ciclos programados para desnaturação ($94^{\circ}\text{C}/1$ minuto), anelamento ($52^{\circ}\text{C}/1$ minuto e 30 segundos) e extensão ($72^{\circ}\text{C}/1$ minuto); as reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33111) e gravados

digitalmente por LPixImage-Loccus Biotecnologia. Como controle positivo foi utilizado DNA de taquizóitos de *N.caninum* da cepa NC-Bahia oriundos de cultivo celular do laboratório de parasitologia veterinária da Universidade Federal da Bahia, e como controle negativo utilizou-se água ultra-pura.

6.2.10. PCR para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Para verificar a integridade do DNA e a ausência de potenciais inibidores, submetemos amostras negativas à PCR para o gene da enzima GAPDH, que amplifica um produto de 400pb. A reação com volume final de 25µL foi composta por 10x de tampão de PCR; 2,0mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 1µM de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase e 5µL de DNA template (BIRKENHEUER et al., 2003). As amplificações foram processadas em um termociclador BioCicler MJ96G com 40 ciclos programados para desnaturação (94°C/ 30 segundos), anelamento (52°C/ 60 segundos) e extensão (72°C/ 60 segundos), as reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos (LACERDA et al., 2017).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Resultado dos equinos

Em 44,63% (158/354) dos equídeos, seus anticorpos reagiram ao antígeno de *S. neurona*, sendo que na titulação o resultado foi 75 com títulos de 80, 35 com 160, 34 com 320, 10 com 640, 2 com 1280 e 2 com 2560. Enquanto que em 9,32% (33/354) dos equídeos, seus anticorpos reagiram ao antígeno de *N. caninum*, Sendo que na titulação o resultado foi 22 com título 50, 5 com 100, 4 com 200 e 2 com 800. É em 5,36% dos equídeos (19/354), seus anticorpos reagiram ao antígeno de *B. besnoiti*, sendo que 13 ficaram com título de 50 e 6 com 100. Foram observadas 3,38% (12/354) de associações de animais que tiveram sua sorologia reativa para antígenos de *N. caninum* e *S. neurona*, 1,41% (5/354) entre *S. neurona* e *B. besnoiti* e 0,84% (3/354) entre *B. besnoiti* e *N.*

caninum, (Figura 5). No Western blotting todas as amostras de equídeos com anticorpos reagentes para antígenos de *B. besnoiti* foram negativas. Todas as amostras de cérebro e masseter de equídeos foram negativas na PCR.

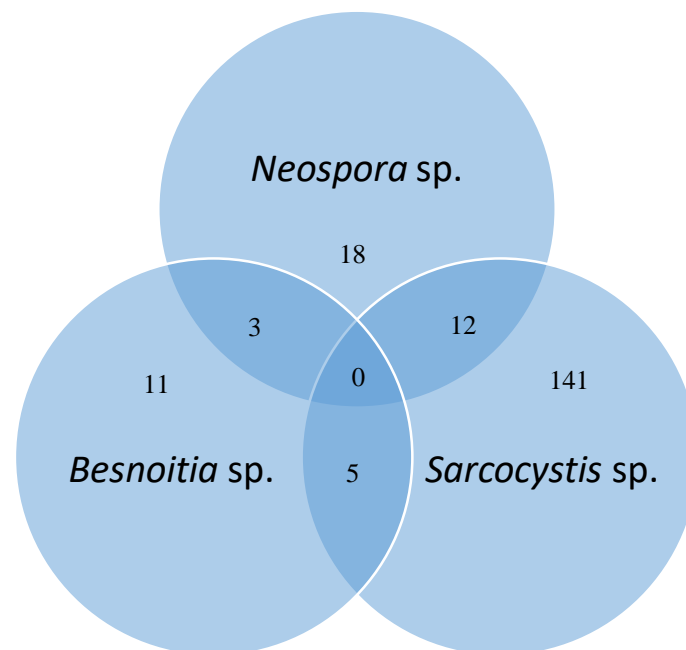


Figura 4. Diagrama de Venn do status sorológico dos equídeos soropositivos para coccídeos de importância em medicina veterinária em equídeos abatidos em um frigorífico no sul do Brasil

6.3.2. Resultado dos Gerbis

Nenhum dos gerbis foi positivo para *Neospora sp.* seja na sorologia, PCR ou na histopatologia.

6.4. DISCUSSÃO

Na América do Norte, região com presença do *D. Virginiana* (DUBEY et al., 2015), Duarte et al., (2003) acreditam que a RIFI é uma forma de diagnóstico

confiável em equinos com EPM, para o diagnóstico do *S. neurona*. No entanto, existem suspeitas da possibilidade de reação cruzada entre *Sarcocystis*, Granstrom et al., (1993) ao realizarem um estudo sorológico entre diferentes espécies de *Sarcocystis* não encontraram essa associação, já Saville et al. (2004) ao infectarem pôneis com esporocistos de *S. fayeri* identificaram reações cruzadas em lâminas com antígeno de *S. neurona* na RIFI, porém no WB essa reação cruzada não ocorreu, se mostrando assim um método confiável para diferenciação entre estes dois agentes, porém é importante destacar que as técnicas de WB realizadas nestes estudos são diferentes. Enquanto que na América do sul, região com a presença do *Didelphis albiventris* (Dubey et al., 2015), Antonello et al., (2015) ao realizarem uma comparação entre antígenos de *S. cruzi* e *S. neurona*, através da RIFI, tiveram 159 equinos positivos, sendo que 57 (35,84%) foram positivos para os dois agentes. Entretanto, não se deve descartar a possibilidade da reação cruzada entre *Sarcocystis* spp. em equinos (TENTER et al., 1995), o que dificulta a determinação na sorologia da espécie envolvida, uma vez que *S. neurona* e *S. fayeri* já foram relatados em equinos nas Américas (DUBEY et al., 1977; DUBEY et al., 2015; ALEMAN et al., 2016).

Este estudo demonstrou uma alta prevalência de equídeos com anticorpos reativos a antígeno de *S. neurona*, o que corrobora com outros estudos no sul do Brasil com prevalências de 33,86%, 41,37% e 36%, respectivamente, (ANTONELLO et al., 2015; CAZAROTTO et al., 2016; PORTELLA et al., 2017). Esses estudos podem ser explicados pelo fato de que a maioria destes animais são criados em áreas que facilitam o seu contato com a fauna silvestre, principalmente os gambás (DUBEY et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). No entanto, Cazarotto et al., (2016) encontraram uma alta prevalência de *Sarcocystis* sp. para equinos, mas, não houve associação positiva destes equinos soropositivos com a presença do Gambá (*Didelphis* sp.). Os cães também são hospedeiros definitivos para *Sarcocystis* sp. em equinos (DUBEY, 1977), e podem, junto com o gambá, estar relacionados com a alta prevalência de *Sarcocystis* sp. em estudos sorológicos.

A soroprevalência de equídeos com anticorpos reagentes a antígenos de *N. caninum* foi baixa em comparação com outro estudo realizado no mesmo frigorífico em que foi encontrada uma soroprevalência de 39,1% (PORTELLA et al., 2017). Muitos estudos epidemiológicos no Brasil demonstram frequência de

animais soropositivos com variação de 0 a 85,7% (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017). A neosporose em cavalos pode estar relacionada a idade, acesso de cães e animais silvestres a fonte de água dos equídeos, consumo somente de pasto (ausência de feno), compra informal de animais, ausência do período de quarentena, condições ambientais, métodos de amostragem e tipos de testes utilizados para diagnóstico (ABDULLAH; ALYOUSIF, 2013; MOURA et al., 2013; LAKOSKI et al., 2015; VALENÇA et al., 2015; CAZAROTO et al., 2016; BARTOVA et al., 2017 CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017), além disso, a transmissão vertical também tem se mostrado como uma via efetiva e de alta transmissão de *Neospora* sp. em equinos (PUSTERLA et al., 2014a; QUEVEDO et al., 2015).

O fato de não obter equídeos positivos no bioensaio e provas moleculares neste estudo pode estar atrelado a uma dificuldade da obtenção do parasita em equídeos clinicamente saudáveis. Dubey et al., (2001) obtiveram um isolado através de um equídeo debilitado, que foi imunossuprimido através de corticoides, enquanto que outros estudos que identificaram equídeos positivos utilizaram provas mais sensíveis como a *nested* PCR e PCR real time (DUBEY et al., 2001; WOBESER et al., 2009; PUSTERLA et al., 2011).

As amostras soropositivas para *Besnoitia* sp. na RIFI não foram confirmadas posteriormente através do WB em equinos, corroborando em parte com o estudo de Villa et al., (2018), em que 90% (18/20) das suas amostras soropositivas na RIFI foram negativas no WB. No entanto neste estudo tivemos algumas associações destas amostras com *Sarcocystis* sp. e *Neospora* sp. o que pode estar relacionado a presença de reação cruzada dos antígenos de *Besnoitia* sp. com estes parasitas (GONDIM et al., 2017; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO et al., 2017). Além disso, este estudo teve outras 3 amostras soropositivas para *Besnoitia* sp. que tiveram associação com amostras soropositivas para *T. gondii* em outro estudo (OLIVEIRA et al., 2019, no prelo). As outras 8 amostras de animais soropositivos para *Besnoitia*, seis com ponto de corte 1:50 e duas 1:100, sem uma co-infecção associada, podem estar relacionadas a possibilidade de reação cruzada com outros coccídios não testados. Associações entre *Neospora* sp. e *Sarcocystis* sp., também foram encontradas neste estudo, o que pode ser explicado pela possibilidade de uma ocorrência de reações cruzadas ou a exposição do equídeo a mais de um destes

agentes (CAZAROTTO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; GONDIM et al., 2017).

No entanto é necessário que mais pesquisas sejam feitas direcionadas em equídeos, já que infecções por *B. bennetti* foram confirmadas nos Estados Unidos (DUBEY et al., 2005; NESS et al., 2012ab) e Bélgica (LIENARD et al., 2018) através da microscopia, sorologia e provas moleculares. Diante disso, propomos que inquéritos sorológicos com a utilização da RIFI em equídeos, tenham o WB e a utilização de provas moleculares para confirmação das amostras positivas (NESS et al., 2014; LIENARD et al., 2018).

6.5. CONCLUSÃO

Conclui-se que existe uma dificuldade no isolamento de *Neospora* sp. em equinos clinicamente saudáveis, soropositivos para este agente. Em relação a *B. bennetti*, não recomendamos a utilização da RIFI como único teste para determinar a exposição dos equídeos ao agente, sendo importante a utilização do WB e provas moleculares para confirmação. Além disso, devido a alta prevalência de *Sarcocystis* sp. que foi encontrada neste estudo e em outros pelo Brasil, levantamos uma suspeita da possibilidade da reação cruzada entre diferentes espécies de *Sarcocystis* em equídeos, sendo recomendado a inserção da presença de canídeos em estudos epidemiológicos de *Sarcocystis* em equídeos.

7.0. CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados deste estudo conclui-se que:

- A possibilidade do risco da infecção por *T. gondii* através do consumo de carne equina crua ou mal cozida para a população humana.
- Este estudo demonstrou que existe uma dificuldade no isolamento para *Neospora* sp. em equinos soropositivos clinicamente saudáveis.
- Em relação a *B. bennetti*, é recomendado o uso do WB e provas moleculares como provas de confirmação em equídeos soropositivos na RIFI.
- Este trabalho também aborda o primeiro relato de cistos de *Sarcocystis* sp. em equinos com caracterização molecular na América do Sul.
- Entretanto, devido a alta prevalência de *Sarcocystis* sp. na sorologia encontrada neste estudo, levantamos uma suspeita da possibilidade de reação cruzada entre diferentes espécies de *Sarcocystis* que podem ser encontradas em equídeos.

8.0. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, D.; ALYOUSIF, S. Seroprevalence of *Neospora* spp. in horses from Central Province of Saudi Arabia. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p.982-985, 2013.

AL-KHALIDI, N. W.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Horses. **The Journal of Parasitology**, v. 65, n.2, p. 331-334, 1979.

ALEMAN, M.; SHAPIRO, K.; SISO, S. *Sarcocystis fayeri* in skeletal muscle of horses with neuromuscular disease. **Neuromuscular Disorders**, v.26, n.11, p.85–93, 2016.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; ALVARADO-ESQUIVEL, D.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic donkeys (*Equus asinus*) in Durango, Mexico slaughtered for human consumption. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.6, 2015.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANTONELLO, A. M.; PIVOTO, F. L.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; POMPERMAYER, E.; VENTURINI, M. C.; VOGEL, F.S.F. Investigaç o de anticorpos contra *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis cruzi* em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterin ria e Zootecnia**, v.67, n.5, p. 1465-1468, 2015.

AROSSI, A.; VIGNOLES, P.; DALMAY, F.; WIMEL, L.; DARD , M.L.; MERCIER, A.; AJZENBERG, D. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. **Parasite**. v.22, n.14 2015.

AYRES, M., JUNIOR, M.A., AYRES, D.L., SANTOS, A.A.S. BioEstat: aplicaç es estat sticas nas  reas das ci ncias bio-m dicas. Vers o 4.0. Bel m: **Instituto de desenvolvimento sustent vel Mamirau **, 2005.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p.236-242, 1994.

BARTOVA, E.; MACHACOVA, T.; SEDLAK, K.; BUDIKOVA, M.; MARIANI, U.; VENEZIANO, V. Seroprevalence of antibodies of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in horses from southern Italy. **Folia Parasitologica**. V.62, n.43, 2015.

BENNETT, S. C. J. A peculiar equine sarcosporidium in the Anglo- Egyptian Sudan. **Veterinary Journal**. v.83, p.297–304, 1927.

BENNETT, S. C. J. Globidium infections in the Sudan. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**. v.46, n.1, p.1–15, 1933.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; ANDBREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asiangenotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.9, p.4172-7 J. 2003.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; Presthus, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n.2, p.271-274, 1984.

CAVALCANTE, G. T.; MONTEIRO, R. M.; SOARES, R. M.; NISHI, S. M.; ALVES, A. F.N.; ESMERINI, P. O.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; GENNARI, S. M. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 179, n. 1-3, p.220-223, 2011.

CAWTHORN, R. J.; CLARK, M.; HUDSON, R.; FRIESEN, D. Histological and ultrastructural appearance of severe *Sarcocystis fayeri* infection in a malnourished horse. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, n.4, p.342-5, 1990.

CAZAROTTO, C. J.; BALZAN, A.; GROSSKOPF, R. K.; BOITO, J. P.; PORTELLA, L. P.; VOGEL, F. F.; FÁVERO, J. F.; DE C CUCCO, D.; BIAZUS, A. H.; MACHADO, G.; DA SILVA, A. S. Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v.99, p.30-35, 2016.

CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. K.; GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 26, n. 3, p. 253-279, 2017.

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

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

CONG, W.; NIE, L. B.; QIN, S. Y.; WANG, W. L.; QIAN, A. D.; MENG, Q. F. Prevalence of *Neospora* spp. in donkeys in China. **Parasite**, v.25, n.16, 2018.

CORTES, H. C.; REIS, Y.; WAAP, H.; VIDAL, R.; SOARES, H.; MARQUES, I.; PEREIRA DA FONSECA, I.; FAZENDEIRO, I.; FERREIRA, M.L.; CAEIRO, V.; SHKAP, V.; HEMPHILL, A.; LEITÃO, A. Isolation of *Besnoitia besnoiti* from

infected cattle in Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.141, n.3-4, p.226-233. 2006.

COSTA, T. L. C.; IGLESIAS, G. A.; ROSA, J. M. A.; BENTO, H. J.; RONDELLI, L. A. S.; FURLAN, F.; MORGADO, T. O.; DUTRA, V.; CORRÊA, S. H. R. Detecção molecular de *Neospora caninum* em macaco-da-noite (*Aotus azarae*) de vida livre no estado do Mato Grosso: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1227-1232, 2018.

COULTOUS, R. M.; RAFTERY, A. G.; SHIELS, B. R.; SUTTON, D. G. M.; WEIR, W. Molecular confirmation of *Sarcocystis fayeri* in a donkey. **Veterinary Parasitology**, v. 240, p.30-33, 2017.

DANGOUDUBIYAM, S. OLIVEIRA, J. B.; VÍQUEZ, C.; GÓMEZGARCÍA, A.; GONZÁLEZ O.; ROMERO, J. J.; KWOK, O. C.; DUBEY, J. P.; HOWE, D. K. Detection of Antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. **Journal of Parasitology**, v.97, n.3, p.522-4, 2011.

DAFT, B. M.; BARR, B. C.; COLLINS, N.; SVERLOW, K. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p.240–243, 1996.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSLINK, J. W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 99-104, 2002.

DUARTE, P. C.; DAFT, B. M.; CONRAD, P. A.; PACKHAM, A. E.; GARDNER, I.A. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.15, n.1, p.8–13, 2003.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v.132, n.4, p.636–662, 1970.

DUBEY, J. P.; STREITEL, R. H.; STROMBERG, P. C.; TOUSSANT, M. J. *Sarcocystis fayeri* sp. n. from the horse. **The Journal of Parasitology**. v.63, n.3, p.443–7, 1977.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **Journal of veterinary diagnostic investigation**. v. 2, n.3, p. 230–233. 1990.

DUBEY, J. P. M. L.; PORTERFIELD. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n.5: 732-734, 1990.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.7, p.1019-1024, 1998a.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**. v.74, p.75–77, 1998b.

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

DUBEY, J. P. Neosporosis--the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1485-1488, 1999b.

DUBEY, J. P.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. **The Journal of Parasitology**. v.85, n.5, p.968–969, 1999 c.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; MCKINNEY, J.; PECORARO M. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.86, n.1, p.59-62 1999d.

DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J. A.; LINDSAY, D. S.; STICH, R. W.; STANEK, J. F.; SPEER, C. A.; ROSENTHAL, B. M.; NJOKU, C. J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; REED, S. M. Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. **The Journal of Parasitology**. v.86, n.6, p.1276–1280, 2000.

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

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., KERBER, C.E., KASAI, N., PENA, H.F., GENNARI, S.M., KWOK, O.C., SHEN, S.K., ROSENTHAL, B.M.,. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**. V.95, n.2-4, p.295–304, 2001b.

DUBEY, J. P. Parasitemia and early tissue localization of *Sarcocystis neurona* in interferon gamma gene knockout mice fed sporocysts. **The Journal of Parasitology**. v.87, n.6, p.1476–1479, 2001c.

DUBEY, J. P., Migration and development of *Sarcocystis neurona* in tissues of interferon gamma knockout mice fed sporocysts from a naturally infected opossums. **Veterinary Parasitology**. v.95, n. 2-4, p.341–351. 2001d.

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

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

DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C.; DONOVAN, T.; ROZMANEC, M.; ROSENTHAL, B. M.; VIANNA, M. C. B.; DAVIS, W. P.; BELDEN, J. S. Redescription of *Besnoitia bennetti* (Protozoa: Apicomplexa) from the donkey (*Equus asinus*). **International Journal Parasitology**. v.35, n.6, p.659–672, 2005.

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

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal Parasitology**. v.38, n.11, p.1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. **2 ed. Boca Raton: CRC Press**, 2010, p.336.

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

DUBEY, J. P.; HOWE, D. K.; FURR, M.; SAVILLE, W. J.; MARSH, A. E.; REED, S.M.; GRIGG, M. E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM), **Veterinary Parasitology**, v. 209, n.1-2, p.1-42, 2015.

DUBEY, J. P.; VAN WILPE, E.; VERMA, S. K.; HILALI, M. Ultrastructure of *Sarcocystis bertrami* sarcocysts from a naturally infected donkey (*Equus asinus*) from Egypt. **Parasitology**. v.143, n.1, p.18-23. 2016.

DUNCANSON, P.; TERRY, R.S.; SMITH, J.E.; HIDE G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. **International Journal Parasitology**. v.31, n.14, p.1699 –1703, 2001.

EDWARDS, G.T. Prevalence of equine *sarcocystis* in British horses and a comparison of two detection methods. **Veterinary Record**. V.115, n.11, p.265–7, 1984.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J.C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **Journal of Infectious Diseases**. v.199, n.2, p.280–285, 2009.

ELLIS, J.T.; HOLMDAHL, O. J. M.; RYCE, C.; NJENGA, J. M.; HARPER, P. A. W.; MORRISON, D. A. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* in cattle, wildebeest and goats. **Protist** 151:329–336, 2000.

EVERS, F.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; ZULPO, D. L.; NINO, B. S. L.; EWALD, M. P. C.; PAGLIARI, S.; ALMEIDA, J. C.; FREIRE, R. L. Diagnosis and isolation of *Toxoplasma gondii* in horses from Brazilian slaughterhouses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.1, p. 58-63, 2013.

FAYER, R.; DUBEY, J.P. Development of *Sarcocystis fayeri* in the equine. **Journal of Parasitology**. v.68, n.5, p.856–860, 1982.

FAYER, R.; ESPOSITO, D. H.; DUBEY, J. P. Human infections with *Sarcocystis* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.2, p.295–311, 2015.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**. V.39, p.783-791, 1985.

FISCHER, S.; ODENING, K. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. **Journal of Parasitology**, v.84, n.1, p.50–4, 1998.

FUKUYO, M.; BATTSETSEG, G.; BYAMBAA, B. Prevalence of *Sarcocystis* infection in horses in Mongolia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v.33, n.4, p.718–19, 2002.

GADAEV, A. On sarcocysts of ass (*Equus asinus*). **Akademii Nauk Uzbekskoi SSR**, v.1, 47–48. 1978.

GENNARI, S. M.; ESMERINI, P. O.; LOPES, M. G.; SOARES, H. S.; VITALIANO, S. N.; CABRAL, A. D; VILLALOBOS, E. M. Occurrences of antibodies to *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.209, p.129–32, 2015.

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

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMPLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**. v.34, n.2 p.159–161, 2004.

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

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

GRANSTROM, D.E., DUBEY, J.P., DAVIS, S.W., FAYER, R., FOX, J.C., POONACHA,K.B., GILES, R.C., COMER, P. Equine protozoal myeloencephali-

tis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.5, n.1, p.88–90, 1993.

GUPTA, G. D.; LAKRITZ, J., KIM, J.H., KIM, D.Y., KIM, J. K., MARSH, A. E. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island South Korea. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.3, p.193-201, 2002.

GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D, GARCÍA-BOCANEGRA I, HOWE DK, ARENAS-MONTES A, YEARGAN MR, NESS SL, ORTEGA-MORA, L.M.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G. A serosurvey of selected cystogenic coccidia in Spanish equids: first detection of anti-*Besnoitia* spp. specific antibodies in Europe. **BMC Veterinary Research**, v.13 n.128, 2017.

HABIBI, G. R.; IMANI, A. R.; GHOLAMI, M. R.; HABLLOVARID, M. H.; BEHROOZIKHAH, A. M.; LOTFI, M.; KAMALZADE, M.; NAJJAR, E.; ESMAEIL-NIA, K.; BOZORGI, S. Detection and identification of *Toxoplasma gondii* type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin Province of Iran. **Iranian Journal of Parasitology**. v.7, n.3, p. 64–72, 2012.

HALL, T. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, v.2, n.1, p.60–61, 2011.

HAMIR, A. N.; TORNQUIST, S. J.; GERROS, T.C.; TOPPER, M.J.; DUBEY, J.P.; *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Parasitology**. v.79, p.269–274. 1998.

HANCOCK, K.; TSANG, V. C. W. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. **Analytical Biochemistry**. V. 133, p.157–162, 1983.

HARADA, S.; FURUKAWA, M.; TOKUOKA, E.; MATSUMOTO, K.; YAHIRO, S.; MIYASAKA, J.; SAITO, M.; KAMATA, Y.; WATANABE, M.; IRIKURA, D.; MATSUMOTO, H.; SUGITA-KONISHI, Y. Control of toxicity of *Sarcocystis fayeri* in horsemeat by freezing treatment and prevention of food poisoning. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v.54, n.3, p.198–203, 2013.

HERD, H. R.; SULA, M. M.; STARKEY, L. A.; PANCIERA, R. J.; JOHNSON, E. M.; SNIDER, T. A.; HOLBROOK, T. C. *Sarcocysts fayeri*-induced granulomatous and eosinophilic myositis in 2 related horses. **Veterinary Pathology**., v. 52, n.6, p.1191-4 2015.

HILALI, M.; NASSAR, A. M. Ultrastructure of *Sarcocystis* spp. from donkeys (*Equus asinus*) in Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 23, n.3-4, p.179–83, 1987.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.8, n.10, p. 634-640, 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p. 41-61, 2005.

HINAIDY, H.K., LOUPAL, G. *Sarcocystis bertrami* Doflein, 1901, a sarcosporidia of the horse. *Equus caballus*. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**. v. 29, n.9. p.681-701, 1982.

HOANE, J. S.; MORROW, J. K.; SAVILLE, W. J.; DUBEY, J. P.; GRANSTROM, D. E.; HOWE, D. K. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.9, p.1050-1056, 2005.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J. Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.1, p.69–75, 2000.

IBRAHIM, H. M.; HUANG, P.; SALEM, T.A.; TALAAT, R. M.; NASR, M. I.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, n.2, p.263-267, 2009.

IRIKURA, D.; SAITO, M.; SUGITA-KONISHI, Y.; OHNISHI, T.; SUGIYAMA, K.; WATANABE, M.; YAMAZAKI, A.; IZUMIYAMA, S.; SATO, H.; KIMURA, Y.; DOI, R.; KAMATA, Y. Characterization of *Sarcocystis fayeri*'s actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea. **Genes to Cells**, v.22, n.9, p.825–835, 2017.

JAMES, K. E.; SMITH, W. A.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A.; PUSTERLA, N. *Toxoplasma gondii* seroprevalence and association with equine protozoal myeloencephalitis: A case– control study. **The Veterinary Journal**, v. 224; p. 38-43, 2017.

KALAMBHE, D.; GILL, J.; SINGH, B. B. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in the slaughter sheep and goats from North India. **Veterinary Parasitology**, v.241, p.35-38, 2017.

KAMATA, Y.; SAITO, M.; IRIKURA, D.; YAHATA, Y.; OHNISHI, T.; BESSHO, T.; INUI, T.; WATANABE, M.; SUGITA-KONISHI, Y. A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning. **Journal of Food Protection**, v.77, n.5, p.814-819, 2014.

KAWAZOE U; MINEO J.R. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. (Ed.). **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo, Atheneu, 2011. p. 163-172.

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

KIRMSE, P.. Sarcosporidiosis in equines of Morocco. **British Veterinary Journal**, v.142, n.70, p.70–72,1986.

KLUN, I.; UZELAC, A.; VILLENA, I.; MERCIER, A.; BOBIĆ, B.; NIKOLIĆ, A.; RAJNPREHT, I.; OPSTEEGH, M.; AUBERT, D.; BLAGA, R.; VAN DER GIESSEN, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. **Parasites and Vectors**, v.10, n.1 p.167, 2017.

KHURANA, S.; BATRA, N. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention. **Tropical Parasitology**, v.6, n. 2, p.123-128, 2016.

LACERDA, L. C; SILVA, A. N.; FREITAS, J. S.; CRUZ, R. D. S.; SAID, R. A.; MUNHOZ, A. D. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.16, n.2, 2017.

LASKOSKI L.M., MURARO L.S., DITTRICH R.L., ABREU R.A., KOCH M.O., SILVA F.T. & HAGI R.H. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em equinos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. **Semina Ciências Agrárias**, v.36, n.2, p. 895-900, 2015.

LÉLU, M.; VILLENA, I.; DARDÉ, M. L.; AUBERT, D.; GEERS, R.; DUPUIS, E.; MARNEF, F.; POULLE, M. L.; GOTTELAND, C.; DUMÈTRE, A.; GILOT-FROMONT, E: Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v.78, n.15, p.5127-5132, 2012.

LEVINE, N. D.; TADROS, W. Named species and hosts of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Systematic Parasitology**, 2, n.1, 41–59. 1980.

LIENARD, E.; NABUCO, A.; VANDENABEELE, S.; LOSSON, B.; TOSI, I.; BOUHSIRA, E.; PREVOT, F.; SHARIF, S.; FRANC, M.; VANVINCKENROYES, C.; CARON, Y. First evidence of *Besnoitia bennetti* infection (Protozoa: Apicomplexa) in donkeys (*Equus asinus*) in Belgium. **Parasites & Vectors**, v.11 n.427, 2018.

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

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D.S.; MITCHELL, S.M.; VIANNA, M.C.; DUBEY, J.P. *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa): description of oocysts, sporocysts,

sporozoites, excystation, and early development. **Journal of Parasitology**, v.90, n.3, p.461–465, 2004.

MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em

http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons/lap_abate_estaduais_cons?p_select=SIM, 15 de março de 2018.

MARSH, A.E.; BARR, B. C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; CONRAD, P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.209, n.11, p.1907-1913, 1996.

MARSH AE, BARR BC, PACKHAM AE, CONRAD PA. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae), **The Journal of Parasitology**, v.84, n.5, p.983–991, 1998.

MARSH, A.E.; HOWE, D.K.; WANG, G.; BARR, B.C.; CANNON, N.; CONRAD, P.A. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n.10, p.1575-1582, 1999.

MATUSCHKA, F.R. Infectivity of sarcocystis from donkey for horse via sporocysts from dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.69, n.3, p.299-304. 1983.

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

MOURA, A. B.; SILVA, M. O.; FARIAS, J. A.; VIEIRA-NETO, A.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; FONTEQUE, J. H.; BUNN, S. *Neospora* spp. antibodies in horses from two geographical regions of the state of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.4, p.597-601, 2013.

MORLEY, P. S.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; BENEDICT, K. M.; SAVILLE, W. J. A.; VOELKER, L. D.; WAGNER, B. A. Risk factors for owner-reported occurrence of equine protozoal myeloencephalitis in the US equine population. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, n.3, p.616-629, 2008.

MURATA, R.; SUZUKI, J.; HYUGA, A.; SHINKAI, T.; SADAMASU K. Molecular identification and characterization of *Sarcocystis* spp. in horsemeat and beef marketed in Japan. **Parasite**. v.25, n.27, 2018.

NAIFF, R. D.; ARIAS, J. R. *Besnoitia* (protozoa: toxoplasmatinae) isolado de mucas *Didelphis marsupialis* na Região Amazônica, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**. v.78, p.431-435, 1983.

NAZIR, M. M.; AYAZ, M. M.; AHMED, A. N.; RASHEED, I.; FARAZ, A.; AKRAM, Q.; AKHTAR, S.; MAQBOOL, A.; TABASSUM, S.; ZHENG, Y.; LINDSAY, D. S.

Prevalence and risk factors for IgG antibodies to *Neospora* spp. in three types of equids from Southern Punjab, Pakistan. **Acta Tropica**. v.88, p.240-243. 2018.

NESS, S.L.; PETERS-KENNEDY, J.; SCHARES, G.; DUBEY, J.P.; MITTEL, L.D.; MOHAMMED, H.O.; BOWMAN, D.D.; FELIPPE, M.J.B.; WADE, S.E.; SHULTZ, N.; DIVERS, T.J. Investigation of an outbreak of besnoitiosis in donkeys in northeastern Pennsylvania. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 240, n.11, p.1329–1337, 2012a.

NESS, S. L.; SCHARES, G.; PETERS-KENNEDY, J.; DUBEY, J.P.; MITTEL, L. D.; MOHAMMED, H. O.; BOWMAN, D. D.; DIVERS, T. J. Evaluation of Immunofluorescent antibody and immunoblot tests for the detection of antibodies against *Besnoitia bennetti* tachyzoites and bradyzoites in donkeys. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.32, n.10, p.54, 2012b.

NESS, S. L.; SCHARES, G.; PETERS-KENNEDY, J.; MITTEL, L.D.; DUBEY, J.P.; BOWMAN, D.D.; MOHAMMED, H.O.; DIVERS, T.J. Serological diagnosis of *Besnoitia bennetti* in donkeys (*Equus asinus*). **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v.26, n.6, p.778-82, 2014.

ODENING, K.. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). **Systematic Parasitology**, v.41, n.3, p.209–233, 1998.

OLIAS, P.; SCHADE, B.; MEHLHORN, H. Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n.7, p.1564–1576, 2011.

OLIVEIRA; U. V.; VARJÃO, J. L.; DEIRÓ, A. G. J.; MENDES, B. M.; PINHEIRO, A. M.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em equinos destinados ao consumo humano, abatidos em um frigorífico no Sul do Brasil. **No prelo**. 2019.

OPSTEEGH, M.; TEUNIS, P.; ZUCHNER, L.; KOETS, A.; LANGELAAR, M.; VAN DER GIESSEN J. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. **International Journal for Parasitology**. v.41, p.343–354. 2011.

OPSTEEGH, M.; MAAS, M.; SCHARES, G.; VAN DER GIESSEN, J.. On behalf of the consortium. Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01). An extensive literature review. **Final report. EFSA Supporting Publications**, 13. 2016.

OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; OLIVEIRA, J. M.; MONTEIRO, L. A. R. C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.16, n.3, p.133-138. 2007.

PAPINI, R. A.; BUZZONE, G.; NARDONI, S.; ROCCHIGIANI, G.; MANCIANTI, F. Seroprevalence and genotyping of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for human consumption in Italy. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.35, n.8, p.657–661, 2015.

PAȘTIU, A. I.; GYÖRKE, A.; KALMÁR, Z.; BOLFĂ, P.; ROSENTHAL, B. M.; OLTEAN, M.; VILLENA, I.; SPÎNU, M.; COZMA, V. *Toxoplasma gondii* in horse meat intended for human consumption in Romania. **Veterinary Parasitology**. v.212, n. 3-4, p.393–5, 2015.

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. **International Journal of Parasitology**, v.31, n.10, p. 1144-1148, 2001.

POMARES, C; AJZENBERG, D; BORNARD, L; BERNARDIN, G; HASSEINE, L; DARDÉ, L; MARTY, P. Toxoplasmosis and horse meat, France [letter]. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.7, p.1327–1328, 2011.

PORTELLA, L. P.; CADORE, G. C.; SANGIONI, L. A.; PELLEGRINI, L. F. V.; FIGHERA, R.; RAMOS, F.; VOGEL, F. S. F. Antibodies against Apicomplexa protozoa and absence sarcocysts in heart tissues from horses in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, n.1, p.100-103, 2017.

PUSTERLA, N., CONRAD, P.A., PACKHAM, A.E., MAPES, S.M., FINNO, C.J., GARDNER, I.A, BARR, B.C., FERRARO, G.L., WILSON, W.D. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. **Journal of Parasitology**, v.97, n.2, p.281-285, 2011.

PUSTERLA, N.; MACKIE, S.; PACKHAM, A.; CONRAD, P.A. Serological investigation of transplacental infection with and in broodmares. *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona*. **The Veterinary Journal**, v. 202, n.3, 649-650, 2014a.

PUSTERLA, N., TAMEZ-TREVINO, E., WHITE, A., VAN GEEM, J., PACKHAM, A., CONRAD, P.A., KASS, P. Comparison of prevalence factors in horses with and without seropositivity to *Neospora hughesi* and/or *Sarcocystis neurona*. **The Veterinary Journal**, v.200, n.2, p.332-334, 2014b.

QUEVEDO, P. S.; AVILA, L. F.C.; SAGGIN, A. S.; TONY, R.; FEIJÓ, L.S.; FREY JR, F. C. B. R.; FARIAS, N. A. R. Verificação da transmissão vertical de *Neospora* spp. em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.1, p.29-32, 2015.

RIBEIRO, M. J. M.; ROSA, M. H. F.; BRUHN, F. R. P.; GARCIA, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; GUIMARÃES, A. M. Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 25 n. 2, p. 142-150, 2016.

ROMMEL, M., GEISEL, O., Studies on the incidence and life cycle of a sarcosporidian species of the horse (*Sarcocystis equicanis* n. spec). **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v.88, p.468-471, 1975.

REED, S. M.; FURR, M.; HOWE, D. K.; JOHNSON, A. L.; MACKAY, R. J.; MORROW, J. K.; PUSTERLA, N.; WITONSKY, S. Equine Protozoal Myeloencephalitis: an updated consensus statement with a focus on parasite biology, diagnosis, treatment, and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.30, n.2, p.491-502, 2016.

SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** . v.74, n.12, p.5463–5467, 1977.

SAVILLE, W. J. A., J. P. DUBEY, M. J. OGLESBEE, C. D. SOFALY, A. E. MARSH, E. ELITSUR, M. C. VIANNA, D. S. LINDSAY, AND S. M. REED. Experimental infection of ponies with *Sarcocystis fayeri* and differentiation from *Sarcocystis neurona* infections in horses. **The Journal of Parasitology**. v. 90, n.6, p.1487–1491, 2004.

SCHULZ, K.C.A; THORBURN, J.A. Globidiosis—a cause of dermatitis in horses. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v.26, p. 39–43. 1955.

SCHARES, G.; BASSO, W.; MAJZOUB, M.; ROSTAHER, A.; SCHARR, J. C.; LANGENMAYER, M. C.; SELMAIR, J.; DUBEY, J. P.; CORTES, H. C.; CONRATHS, F. J.; GOLLNICK, N. S. Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. **Veterinary Parasitology**, v,171, n.1-2, p.32–40, 2010.

SHWAB, E. K.; ZHU, X-Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, 141, 453-461. 2014.

SPEER, C.A., DUBEY, J.P. Ultrastructure of schizonts and merozoites of *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**. v.95, n. 2-4, p.263–271. 2001.

SPENCER, J.A., WITHEROW, A.K., BLAGBURN, B.L. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. **The Journal of Parasitology**, v.86, n.6, p.1366–1368, 2000.

SOKAL, R. R. A statistical method for evaluating systematic relationships. **The University of Kansas science bulletin**, v. 38, p. 1409–1438, 1958.

SPÓSITO FILHA, E.; AMARAL, V; MACRUZ, R.; REBOUÇAS, M.M.; SANTOS, S.M.; BORG, F. Infecção experimental de equinos com taquizoítos de

Toxoplasma gondii. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p.51-54, 1992.

STANCIU S. Horse Meat consumption - between scandal and reality. **Procedia Economics and Finance**, v.23, p.697–703, 2015.

TAVALLA, M; SABAGHAN, M.; ABDIZADEH, R.; KHADEMVAATAN, S.; RAFIEI, A.; PIRANSHAHI, A. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. Infections in Arab Horses, Southwest of Iran. Jundishapur **Journal of Microbiology**, v.8, n.3, 2015.

TENTER, A.M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. **International Journal Parasitology**, v.25, p.1311-1330, 1995.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal Parasitology**, v.30, n. 12-13, p.1217-1258, 2000.

THILSTED, J. P.; J. P. DUBEY. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, n.3, p.205-209, 1989.

TOSCAN, G.; VOGEL, F.S.F.; CADORE, G.C.; CEZAR, A.S.; SANGIONI, L.A.; PEREIRA, R.C.F.; OLIVEIRA, L.S.S.; LOPES, S.T.A.. Occurrence of antibodies anti-*Neospora* spp. in cart horses and Crioula breed horses from Rio Grande do Sul state. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v,63, n.1, p.258-261, 2011.

TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; MCALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v.6, n.5, p.765-767, 1999.

TURNER, C.B.; SAVVA, D. Evidence of *Toxoplasma gondii* in an equine placenta. **The Veterinary Record**, v.127, n.5, p. 96, 1990.

TURNER, C. B.; SAVVA, D. Detection of *Toxoplasma gondii* in equine eyes. **The Veterinary Record**, v.129, n.6, p.128, 1991.

UZÊDA, R.S; ANDRADE, L.G; CORBELLINI, A.M; ANTONELLO, F.S; VOGEL; GONDIM. LFP. Frequency of antibodies against *Besnoiti* in Brazilian cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p.242-246, 2014.

VALENÇA, S. R. A.; VALENÇA, R. M. B.; JUNIOR, J. W. P.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; NETO, O. L. S.; MOTA, R. A. M. Risk Factors for Occurrence of Anti-*Neospora* spp. Antibodies in Horses From Alagoas, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n.11–12, p.917-921, 2015.

VARDELEON, D.; MARSH A. E.; THORNE J. G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON P. J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona*

antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 273-282, 2001.

VENTURINI, L.; PETRUCCELLI, M.; PISCOPO, M.; UNZAGA, J. M.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; DUBEY, J. P. Natural *Besnoitia* sp infection in domestic rabbits from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.273–278, 2002.

VIDOTTO, O.; KANO, F .S.; FREIRE, R .L.; MITISUKA, R.; OGAWA, L.; BONESI, G.; NAVARRO, I. T.; FRANCISCON, F. S. G. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em equinos procedentes de 4 estados (SP, PR, MS, MT) abatidos em Apucarana, no Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.18, n.1, p.9-13, 1997.

VILLA, L.; GAZZONIS, A. L.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; DIEZMA-DÍAZ, C.; ZANZANI, S. A.; MANFREDI, M. T. First detection of anti- *Besnoitia* sp. specific antibodies in horses and donkeys in Italy. **Parasitology International**, v.67, n.5, p.640–643, 2018.

WALSH, C. P.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N.; ZAJAC, A. M.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S. MOLECULAR COMPARISON OF THE DENSE granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. . **International Journal Parasitology**, v.31, n.3, p.253-258, 2001.

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

XING, H.; XU, L.; SONG, X.; LI, X.; YAN, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in horses in Xinjiang, Northwestern China. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.60, p11-15, 2018.

YANG, N.; MU, M. Y.; YUAN, G. M.; ZHANG, G. X.; LI, H. K.; HE, J. B.; Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered horses and donkeys in Liaoning province, northeastern China. **Parasites and Vectors**, v.6, n.1,p.140, 2013.

YEARGAN, M. R., ALVARADO-ESQUIVEL, C., DUBEY, J. P., HOWE, D. K. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. **Parasite**, v.1, n.1, p..20-29, 2013.

ZENG, W.; SUN, L.; XIANG, Z.; LI, N.; ZHANG, J.; HE, Y.; LI, Q.; YANG, F.; HU, J.; SONG, J.; MORRIS, J.; ROSENTHAL, B.M.; YANG, Z. Morphological and molecular characteristics of *Sarcocystis bertrami* from horses and donkeys in China. **Veterinary Parasitology**. v.252, p.89-94, 2018.

9.0. APRESENTAÇÃO DA APROVAÇÃO DO PROTOCOLO POR COMITÊ DE ÉTICA.

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC) – Protocolo nº 020/13.

10.0. APÊNDICES

10.1. APÊNDICE A

Distribuição por município dos equídeos coletados no Frigorífico foresta com suas respectivas soropositividade para *Toxoplasma gondii*, *Neospora sp.*, *Sarcocystis sp.* e *Besnoitia sp*

CIDADE	T+	T-	N+	N-	S+	S-	B+	B-	TOTAL
ACEGUÁ	2	9	0	11	0	11	1	10	11
ALEGRETE	7	53	3	57	27	33	2	58	60
AMARAL FERRADOR	5	1	0	6	3	3	0	6	6
BAGÉ	0	1	0	1	1	0	0	1	1
BOM JESUS	5	9	7	7	3	11	0	14	14
BOSSOROCA	2	6	0	8	4	4	0	8	8
CACEQUI	0	4	0	4	2	2	0	4	4
CACHOEIRA DO SUL	2	6	0	8	3	5	0	8	8
CANGUNÇU	2	11	1	12	5	8	0	13	13
ENCRUZILHADA DO SUL	1	3	0	4	1	3	0	4	4
ITAQUI	1	13	0	14	10	4	2	12	14
JAGUARI	0	3	0	3	0	3	0	3	3
JÚLIO DE CASTILHOS	0	1	0	1	1	0	1	0	1
MAÇAMBARA	1	8	0	9	3	6	1	8	9
MATA	0	1	0	1	0	1	0	1	1
PEDRAS ALTAS	9	11	4	16	14	6	2	18	20

CIDADE	T+	T-	N+	N-	S+	S-	B+	B-	TOTAL
PELOTAS	0	2	0	2	0	2	0	2	2
PIRATINI	0	5	0	5	3	2	1	4	5
ROSÁRIO DO SULz	0	13	0	13	10	3	0	13	13
SANTA CRUZ DO SUL	1	2	0	3	2	1	1	2	3
SANTA MARIA	1	5	0	6	3	3	1	5	6
SANTA VITÓRIA DO PALMAR	4	6	0	10	7	3	0	10	10
SANTANA DA BOA VISTA	0	18	0	18	2	16	0	18	18
SANTANA DO LIVRAMENTO	12	27	3	36	33	6	1	38	39
SÃO FRANCISCO DE PAULA	7	11	9	9	4	14	4	14	18
SÃO GABRIEL	2	14	2	14	4	12	1	15	16
SÃO LOURENÇO	0	2	0	2	1	1	0	2	2
SÃO MARTINHO DA SERRA	0	2	0	2	2	0	0	2	2
SÃO SEPÉ	0	7	1	6	4	3	0	7	7
URUGUAIANA	1	10	1	10	5	6	0	11	11
VACARIA	2	7	0	9	5	4	0	9	9
CAÇAPAVA	0	14	0	14	7	7	0	14	14
DOM FELICIANO	1	1	1	1	0	2	1	1	2
TOTAL	68	286	32	322	169	185	19	335	354

T+= *Toxoplasma gondii* soropositivo; T-= *Toxoplasma gondii* soronegativo; N+= *Neospora* sp. soropositivo; N-= *Neospora* sp. soronegativo; S+= *Sarcocystis* sp. soropositivo; S-= *Sarcocystis* sp. soronegativo; B+= *Besnoitia* sp. soropositivo; B-= *Besnoitia* sp. soronegativo.

11. ANEXOS

11.1. ANEXO A

Protocolo da Reação de Imunofluorescência - RIFI PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii*, ANTI-*Sarcocystis*. sp., ANTI-*Neospora* sp. e ANTI-*Besnoítia* sp.

Procedimentos para contagem de taquizoítos ou merozoítos:

- Preencher a câmara de *Neubauer* com os taquizoítos ou merozoítos.
- Realizar contagem em cinco dos 25 quadrantes centrais.
- Multiplicar o resultado por 50, o que corresponde à quantidade de taquizoítos por μL . O número ideal é de 1.500 – 2.000 taquizoítos ou merozoítos/ μL para preparo do antígeno.
- Diluir o material ressuspenso para uma concentração de 1.500 a 2.000 taquizoítos por μL .

Preparo das Lâminas:

- Adicionar 10 μL do antígeno em cada poço da lâmina.
- Secar em estufa a 37°C por aproximadamente 30 minutos.
- Fixar em metanol por cinco minutos
- Acondicionar em lenço de papel e papel alumínio armazenando a -20°C, até o momento do uso.

Execução da técnica de RIFI:

- Lavar as lâminas em PBS por 5 minutos.
- Secar as lâminas em temperatura ambiente ou estufa a 37°C (tempo = até secar).
- Diluir o soro com os pontos de corte de 1:64, 1:50, 1:50 e 1:80, respectivamente, para *T. gondii*, *Neospora* sp., *Besnoítia* sp e *Sarcocystis* sp.
- Adicionar 10 μL da diluição das amostras de soro.
- Adicionar 10 μL dos soros controles positivo e negativo.
- Incubar a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida.
- Lavar as lâminas duas vezes com PBS por 5 minutos.
- Secar as lâminas a temperatura ambiente.
- Diluir o conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) em solução de PBS-Azul de Evans (0,5%), de acordo com o título determinado no Laboratório.
- Adicionar 10 μL do conjugado diluído em cada poço e proteger da luz.
- Incubar a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida, sempre protegendo da luz.
- Lavar as lâminas duas vezes com PBS por 5 minutos (protegendo da luz).

- Secar as lâminas a temperatura ambiente.
- Adicionar uma gota de glicerina entre os poços e cobrir com lamínula.
- Fazer a leitura em objetiva de 40x no microscópio com lâmpada de mercúrio de alta pressão USH102 e filtro de seleção de comprimento de onda de 450 nm.

11.2. ANEXO B

Protocolo de Extração de DNA de tecido

Isolamento do DNA

- Pesar e transferir 100 mg de tecido para um tubo de eppendorf de 2,0mL livre de Dnase e Rnase.
- Adicionar Nitrogênio líquido para o eppendorf
- Macerar com o auxílio de um bastão de vidro
- Adicionar 350 µL da solução A e vortequizar para a solução ficar uniformemente dispersa.
- Incubar no banho maria seco a 65°C por 10 minutos
- Adicionar 150 µL da solução B e vortequizar vigorosamente ate que o precipitado se mova e a amostra fique uniformemente viscosa.
- Adicionar 500 µL de clorofórmio e vortequizar ate a viscosidade diminua e a mistura fique homogênea.
- Centrifugar na velocidade máxima por 20 minutos a 4°C para separar as fases.
- Transferir a fase superior para um novo tubo eppendorf livre de dnase e rnase de 1,5mL.

Precipitação do DNA

- Adicione 1 mL de etanol absoluto (-20°C) à solução de DNA e agite rapidamente no vórtice.
- Incube o tubo no gelo por 30 minutos
- Centrifugue a velocidade máxima durante 15 minutos a 4°C.
- Remova o etanol e deixe o pellet com o auxílio de uma pipeta.
- Adicione 500 µL de etanol (80%) e mistura invertendo o tubo 5 vezes
- Centrifugue a velocidade máxima durante 5 minutos a 4°C. Remova o etanol com o auxílio de uma pipeta.
- Centrifugue a velocidade máxima durante 3 minutos a 4°C. Remova o etanol com o auxílio de uma pipeta.
- Ressuspender o sedimento em 100mL TE buffer. Adicione 2 µL de Rnase.
- Incube a 37°C por 30 minutos.
- DNA está pronto para a realização da PCR.

11.3. ANEXO C

Bioensaio

- As amostras foram homogeneizadas individualmente com PBS através do uso de um *Sheiker*
- O homogeneizado será colocado em um *Erlenmeyer* e, a este, adicionada solução de pepsina ácida até completar o volume de 200ml.
- Cada *Erlenmeyer*, contendo o material de cada amostra a ser digerida, será colocado em uma incubadora *shaker* e mantido à temperatura de 37°C por uma hora.
- Decorrido este tempo, cada amostra digerida será passada em tamis com gaze dupla e o filtrado de cada uma destas será então centrifugado a 1200g por 10 minutos.
- Após a centrifugação o sobrenadante será descartado e ao material restante adicionar-se-á solução neutralizadora de bicarbonato de sódio até completar o volume de 50ml.
- Novamente o material será centrifugado a 1200g por 20 minutos e o sobrenadante descartado.
- Por fim, a cada uma das amostras serão adicionados de 5 a 10ml de solução antibiótica, contendo 1000UI de penicilina G potássica e 100mg de estreptomicina por ml de solução.
- O sedimento será ressuscitado e utilizado como inóculo