

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**CÃES SORORREAGENTES A *Neospora caninum* DUBEY,
CARPENTER, SPEER, TOPPER E UGGLA, 1988 (APICOMPEXA:
TOXOPLASMATINAE) NA BARRA DA TIJUCA, REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, RJ**

LIANNA MARIA DE CARVALHO BALTHAZAR

Seropédica, RJ

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CÃES SORORREAGENTES A *Neospora caninum* DUBEY,
CARPENTER, SPEER, TOPPER E UGGLA, 1988 (APICOMPEXA:
TOXOPLASMATINAE) NA BARRA DA TIJUCA, REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, RJ**

LIANNA MARIA DE CARVALHO BALTHAZAR

Sob a orientação do Professor

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

Coorientador

Dr. Walter Leira Teixeira Filho

Tese submetida como requisito para
obtenção do grau de **Doutora em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias – Área de
concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ

2015

636.7089696

B197c

T

Balthazar, Lianna Maria de Carvalho, 1959-
Cães sororreagentes a *Neospora caninum*
Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla,
1988 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) na Barra
da Tijuca, Região Metropolitana do Rio de
Janeiro, RJ / Lianna Maria de Carvalho
Balthazar. - 2015.

85 f.: il.

Orientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.
Bibliografia: f. 42-54.

1. Cão - Parasito - Teses. 2. Cão -
Doenças - Teses. 3. Cão - Infecções -
Teses. I. Lopes, Carlos Wilson Gomes, 1947-
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

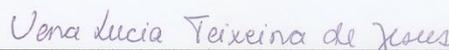
LIANNA MARIA DE CARVALHO BALTHAZAR

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 26/02/2015



Dr. Bruno Pereira Berto, D.Sc. UFRRJ



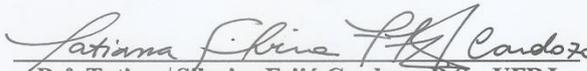
Dr^a. Vera Lúcia Teixeira de Jesus, D.Sc. UFRRJ



Dr. Sergio Vianna Cardozo, D.Sc. UNIGRANRIO



Dr^a. Elan Cardozo Paes de Almeida, D.Sc. UFF



Dr^a. Tatiana Silveira Feijó Cardozo, D.Sc. UFRJ



Dr. Walter Leira Teixeira Filho, Ph.D. UFRRJ

“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto na estação própria, e cujas folhas não caem, e tudo quanto fizer prosperará.”

Salmos, cap. 1.v.3, Bíblia Sagrada.

DEDICATÓRIA

A Deus todo poderoso, que me direciona e me fortalece a cada dia, e, me abençoou para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Edir Sixel Balthazar e Maria do Socorro de Carvalho Balthazar, in memoriam, por todo amor, carinho e, por tudo que me ensinaram.

Aos meus filhos Erick Balthazar de Souza Alves e Laura Balthazar de Souza Alves pela motivação, amor e compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis que sempre acreditaram na conclusão de mais essa etapa.

A Maria Iracy Carvalho de Paula e Diolita de Sales Alves, in memoriam, pelo apoio e suporte constantes que jamais serão esquecidos.

As minhas irmãs Anna Elisa Balthazar Jurema e Ilza Maria de Carvalho Balthazar pela amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me apoiaram e ajudaram com sugestões e recomendações para a conclusão desse trabalho.

Em especial, ao Professor Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes do Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC), antigo Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ) (PSA), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela orientação, dedicação, amizade e acima de tudo pela paciência, por acreditar em mim e me incentivar sempre!

Ao Dr. Walter Leira Teixeira Filho também do LCC/PSA/DPA/IV/UFRRJ como coorientador, pela grande amizade, pelos conselhos e inestimáveis sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Coccídios e Coccidioses, especialmente ao professor Dr. Bruno Pereira Berto, pela amizade e parceria, aos Drs. Gisele Santos de Meireles, Landreani Ramirez Gonçalves, Cleide Domingues Coelho, Janaína da Soledad Rodrigues, Gideão da Silva Galvão, aos colegas de doutorado Caroline Spitz dos Santos e Bruno do Bomfim Lopes, e a colega Caroline Cunha Carreiro do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária por toda compreensão, paciência e amizade.

Ao Dr. Paulo Daniel de Sant'Ana Leal, pela soroteca cedida do seu CTI Veterinário, o meu muito obrigado.

Ao Dr. Ulisses Jorge Pereira Stelmann, querido amigo, meu muito obrigado por todo apoio, compreensão, paciência e amizade.

Ao Dr. Gilberto Flausino, por todas as caronas! Muito obrigada meu querido amigo tricolor!

A Professora Dra.Vera Lúcia Teixeira de Jesus, muito obrigada pela amizade, incentivo e momentos de descontração. Você foi (tem sido!) uma benção para mim!

Finalmente a CAPES, FAPERJ (bolsista nota 10) agradeço por ter sido agraciada com bolsa de doutorado e ao CNPq por financiar em parte este projeto de pesquisa.

BIOGRAFIA

LIANNA MARIA DE CARVALHO BALTHAZAR, filha de Edir Sixel Balthazar e Maria do Socorro de Carvalho Balthazar, brasileira, nasceu em 25 de outubro de 1962, em Jaboatão dos Guararapes em Pernambuco.

Iniciou sua formação profissional em 1979, ingressando no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e graduando-se como médica veterinária em julho de 1983.

Desde então trabalhou no *Jockey Club* do Rio de Janeiro por 10 anos, como estagiária e médica veterinária, e também em diversos haras nos estados de Pernambuco, Paraná e Rio de Janeiro, e atuando também em clínicas veterinárias com animais de companhia em Guapimirim e Teresópolis, RJ.

Em Março de 2009, iniciou o Mestrado no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, na área de concentração: Parasitologia sob a orientação do Professor Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes, se titulando Mestre em Ciências Veterinárias - Parasitologia Veterinária em fevereiro de 2011. E em março de 2011, ingressou no doutorado do mesmo Programa de Pós-Graduação, também, sob a orientação do mesmo Professor na área de concentração: Sanidade Animal.

RESUMO

BALTHAZAR, Lianna Maria de Carvalho *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em cães sororreagentes na Barra da Tijuca, região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. 2015, 85p. Tese (Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

Um total de 402 amostras sorológicas obtidas de cães de um Centro de Tratamento Intensivo (CTI Veterinário), num período de 18 meses, localizado na Barra da Tijuca, região metropolitana do Rio de Janeiro, foram utilizadas para determinar a presença de animais sororreagentes a *N. caninum* e determinar as variáveis que poderiam estar associadas a presença desse agente etiológico em cães da região estudada. A presença de animais sororreagentes a RIFI para *N. caninum* foi de 8,46% (34/402) onde a idade foi fator de risco de infecção, haja vista tratar-se de animais com idade que variaram de três meses até 19 anos, porém com a grande maioria acima de 10 anos, sendo que os animais que moravam em apartamento tiveram duas vezes mais fator de proteção. Porém, os animais de porte pequeno foram os mais sororreagentes a infecção por *N. caninum*. Apesar de dois dos animais apresentarem sinais neurológicos não se pode correlacioná-los com a infecção por *N. caninum*, por serem sororreagentes positivos; o que indica que animais com neuropatias necessariamente não estejam vinculados a neosporose. Mediante os resultados encontrados observa-se estreita relação entre a infecção natural e a faixa etária dos animais, porém não se deve subestimar o sexo e alimentação na dispersão de *N. caninum* entre os cães da região estudada, sendo esta, a primeira citação da presença de *N. caninum* no estado do Rio de Janeiro.

Palavras chave: *Neospora caninum*, RIFI, cães, idade, CTIVeterinário.

ABSTRACT

BALTHAZAR, Lianna Maria de Carvalho. *Neospora caninum Neospora caninum Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla, 1988 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) in seropositive dogs at Barra da Tijuca in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, RJ.* 2015, 85p. Thesis (Veterinary Science, Animal Health). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

A total of 402 serum samples obtained from dogs of a Veterinary Intensive Care Unit (CTI Veterinário), over a period of 18 months, located in Barra da Tijuca, metropolitan region of Rio de Janeiro, RJ., were used to determine the presence of animals seropositive to *N. caninum* and determine the variables that could be associated with the presence of etiological agent in dogs of the studied region. The presence of seropositive animals to IFAT for *N. caninum* was 8.46% (34/402) where the age was infection risk factor, given that this in animals with age ranging from three months to 19 years, but with the vast majority of over 10 years, and the animals that lived in the apartment were twice as protective factor. However, the small animals were the most seropositive infection by *N. caninum*. Although two of the animals show neurological signs cannot correlate them with the infection by *N. caninum* seropositive to be positive; indicating that animals with neuropathies necessarily are not linked to neosporosis. By the results observed close relationship between natural infection and the age of the animals, but one should not underestimate the gender and feed in the dispersal of *N. caninum* among dogs of the studied region, which is the first mention of the presence *N. caninum* in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

Key words: *Neospora caninum*, IFAT, dogs, age, Veterinary Intensive Care.

LISTA DE TABELAS

Págs

Tabela 1. Importância da faixa etária em cães sororreagentes a <i>Neospora caninum</i> na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ	28
Tabela 2. Importância da habitação na infecção natural de cães por <i>Neospora caninum</i>	29
Tabela 3. Importância da convivência com a presença de outros animais na infecção natural por <i>Neospora caninum</i> em cães	30
Tabela 4. Importância da alimentação na infecção natural por <i>Neospora caninum</i> em cães ..	31
Tabela 5. Importância do sexo na infecção natural por <i>Neospora caninum</i> em cães	33
Tabela 6. Importância do porte dos animais sororreagentes a <i>Neospora caninum</i>	33
Tabela 7. Importância dos cães de pequeno porte entre os animais sororreagentes a <i>Neospora caninum</i>	34
Tabela 8. Importância dos cães de médio porte entre os animais sororreagentes a <i>Neospora caninum</i>	34
Tabela 9. Importância dos cães de grande porte entre os animais sororreagentes a <i>Neospora caninum</i>	35
Tabela 10. Importância do contato com a rua na infecção natural por <i>Neospora caninum</i> em cães	36
Tabela 11. Importância dos sinais clínicos neurológicos na infecção natural por <i>Neospora caninum</i> em cães	37
Tabela 12. Importância da vacinação na infecção natural por <i>Neospora caninum</i> em cães	37
Tabela 13. Regressão logística entre as variáveis associadas a cães sororreagentes para <i>Neospora caninum</i>	38

LISTA DE FIGURAS

	Págs
Figura 1. Ciclo de vida doméstico e silvestre de <i>Neospora caninum</i> incluindo os animais cuja participação no ciclo foi confirmada experimentalmente. (Cortesia: Dr. Luis F. P. Gondim)	8
Figura 2. Taquizoitos com fluorescência periférica total ao RIFI, sororreativo a <i>Neospora caninum</i> . Obj. 40 X	26
Figura 3. Taquizoitos com fluorescência parcial ou apical ao RIFI negativo para <i>N. caninum</i> . Obj. 40 X	26

LISTA DE ANEXOS

	Págs
Anexo 7.1 Declaração do CTIVeterinário	53
Anexo 7.2 Declaração da CEUA/IV/UFRRJ	56
Anexo 7.3 Ficha clínica dos animais	57
Anexo 7.4 Ficha do exame físico do animal	58
Anexo 7.5 Aspectos epidemiológicos em Cães sororreagentes a <i>Neospora caninum</i> procedentes de região urbana da cidade do Rio de Janeiro, RJ	59
Anexo 7.6 Fatores de Risco para a infecção de <i>Neospora caninum</i> em cães da cidade do Rio de Janeiro, RJ: modelo final para a regressão logística com resultados de fatores de risco (RR) e com 95% de intervalo de confiança (IC) com probabilidade de até 30%	61
Anexo 7.7 LOPES, B. DO B.; BERTO, B.P.; BALTHAZAR, L.M. DE C. ; COELHO, C.D.; NEVES, D.M.; LOPES, C.W.G. psittaciform birds (Aves: Psittaciformes): <i>Eimeria ararae</i> n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the blue-and-yellow macaw <i>Ara ararauna</i> (Linnaeus). <i>Systematic Parasitology</i> , v. 88, n. 2 p. 175–180, 2014	62
Anexo 7.8 BALTHAZAR, L.M. DE C. ; LOPES, B. DO B., BERTO, B.P., DOS SANTOS, C.S.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; NEVES, D.M.; LOPES C.W.G. Coccidiose em um papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) mantido em confinamento - Relato de caso. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , v. 35, n. 4, p. 392-396, 2013	69
Anexo 7.9 LOPES, B. DO B.; BALTHAZAR, L.M. DE C. ; COELHO, C.D.; BERTO, B.P.; NEVES, D.M.; LOPES, C.W.G. Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: <i>Isospora trincaferri</i> Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator <i>Saltator maximus</i> Müller (Passeriformes: Cardinalidae). <i>Coccidia</i> , v. 1, n. 2, p. 6-9, 2013	75

Anexo 7.10 BALTHAZAR, L.M. DE C.; LEAL, P.D.S.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Cães sororreagentes a *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) atendidos em uma clínica veterinária na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, supl.2, p. 48-51, 2013 80

LISTA DE ABREVIACÕES, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

PCR - Reação de cadeia por polimerase.

HIV - Vírus da imunodeficiência humana.

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta.

ELISA - Teste imunoenzimático.

NAT - Teste modificado de aglutinação.

IgG - Imunoglobulina G.

HI - Histopatológico.

IHQ - Imunohistoquímica.

SNC - Sistema nervoso central.

mg – Miligrama.

kg – Kilograma.

RNA - Ácido ribonucleico.

OMS - Organização mundial de saúde.

g - Grama.

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária.

LCC - Laboratório de Coccidios e Coccidioses.

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

dL - Decilitro.

PBS - Solução fisiológica fosfatada tamponada.

pH - Potencial de hidrogênio.

µL – Microlitro.

^a. Panótico Rápido LB- Laborclin produtos para laboratórios Ltda, Rua Casemiro de Abreu, 521 Pinhais, PR.

^b. Ms4-Vet-Melet Schloesing Laboratoires coulter, Melet Schloesing Laboratoires 9, Chaussée Jules César 95520 Osny - França.

^c. Centrífuga Micro-Hematócrito E3500108 *MICROSPIN* CDR, Rua Japão, 150, Bairro Sorocabano, Jaboticabal, SP.

^d. *Eclipse E200*, Nikon Instruments Inc. Japão.

- e. Refratômetro clínico modelo Q667, Quimis Aparelhos Científicos, Rua Gema, 278/308, Diadema, SP.
- f. Centrifuga Mod. 208N. Excelsa Baby, marca Fanem Ltda, Av. General Ataliba Leonel, 1.790, São Paulo, SP.
- g. Conjunto Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda, rua Leiria, 1160, segundo, Sl. 14, São Francisco, Belo Horizonte, MG.
- h. Bioplus mod. BIO 200 F Campus do Vale – UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43.421 - Sl. 107. Porto Alegre, RS.
- i. Modelo GCSCO₂G, Beiramar ind. e com. Ltda, Rua Capitão Otávio Machado, 662 Chácara Santo Antônio, SP.
- j. Perfecta Indústria e Comercio de Lâminas de Vidro Ltda, Rua Ibitinga, 538, Bertioga, São Paulo, SP.
- k. Modelo 002 CB, marca Fanem Ltda, Av. General Ataliba Leonel, 1.790, São Paulo, SP.
- l. Benfer do Brasil, Rua Padre Agostinho Poncet, 74, São Paulo, SP.
- m. IgG anti-cão, produzido em coelho, SIGMA® F7884, EUA.
- n. Zeiss Lab. A1 AXIO, Microscopy GmbH Carl Zeiss Promenade 1007745, Jena, RFA.

SUMÁRIO

	Págs
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 HISTÓRICO	3
2.2 TAXONOMIA	4
2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS	5
2.3.1 Morfobiologia	5
2.3.2 Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	6
2.4 EPIDEMIOLOGIA	7
2.4.1 Distribuição geográfica da Neosporose em cães	7
2.4.2 Importância da vida selvagem na dispersão de <i>Neospora caninum</i> ...	10
2.4.3 A neosporose como fator zoonótico	10
2.5 ASPECTOS CLÍNICOS DA NEOSPOROSE	10
2.6 DIAGNÓSTICO	12
2.6.1 Exame de fezes	12
2.6.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	12
2.6.3 Imunofluorescência (RIFI) e Elisa	13
2.6.4 Histologia e Imunohistoquímica (IHQ)	15
2.7 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-<i>Neospora caninum</i> EM CÃES NO BRASIL	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO	21
3.1.1 Animais de Estudo	21
3.1.2 Avaliação Clínica e Conduta Clínica	21
3.1.3 Determinação do Número de Amostras e Aplicação do Questionário	22
3.1.4 Coleta, Processamento e análise das amostras	22
3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS	23
3.2.1 Processamento do Soro Sanguíneo	23
3.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	23

	Págs
3.2.2.1 Obtenção do material utilizado para identificação dos animais sororreagentes para <i>Neospora caninum</i>	23
3.2.2.2 Diluição dos Soros Caninos	23
3.2.2.3 Preparação do Conjugado	24
3.2.3 Leitura da Reação de Imunofluorescência Indireta	24
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COMO TESTE DE DIAGNÓSTICO	27
4.2 O CÃO E A POSITIVIDADE PARA <i>Neospora caninum</i> NO RIO DE JANEIRO	27
4.2.1 Faixa etária e suas consequências	28
4.2.2 Influência da Moradia	29
4.2.3 Presença de outras espécies animais	30
4.2.4 Hábitos alimentares	31
4.2.5 Sexo e suas consequências	32
4.2.6 Porte dos Animais e a sororreação a <i>Neospora caninum</i>	32
4.2.7 Contato com ambiente externo a moradia	35
4.2.8 Sinais clínicos neurológicos	36
4.2.9 Vacinação	37
4.2.10 Regressão logística	38
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	39
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8 ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Neosporose é uma doença parasitária de caráter cosmopolita, possuindo como agente etiológico o protozoário *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988, reconhecido como causador de aborto em bovinos, acarretando sérios prejuízos econômicos tanto para a pecuária leiteira quanto de corte, provocando perdas embrionárias, abortamento e quadros de alterações nervosas e, por acarretar distúrbios neurológicos em cães.

A doença foi primeiramente observada na Noruega em cães com meningo-encefalite e miosite, no entanto, quando o material foi examinado ao microscópio óptico, foi constatada a sua semelhança com *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) Nicolle & Manceaux, 1909 que pode causar lesões similares, porém, não reagiu imuno-histoquimicamente com anticorpos anti-*T. gondii*.

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e a família Sarcocystidae que tem carnívoros como hospedeiros definitivos e uma ou mais espécies de possíveis presas como hospedeiros intermediários, e assim, como no ciclo de vida do *T. gondii* necessita de dois hospedeiros para se reproduzir. Ele infecta canídeos domésticos e selvagens, e outros carnívoros podem ser infectados naturalmente pela ingestão de cistos presentes principalmente no sistema nervoso central, pela ingestão de placentas infectadas de bovinos e músculos infectados ou ainda ser infectado verticalmente durante a vida intrauterina, além da possibilidade de infecção por via feco-oral de oocistos disseminados por canídeos infectados.

O cão desempenha papel fundamental na epidemiologia da neosporose por ser o hospedeiro definitivo deste protozoário, e vivendo em contato direto com o homem, podemos pensar na neosporose como sendo uma questão de saúde pública. A prevalência de anticorpos para este protozoário em cães tem sido avaliada em vários países, inclusive no Brasil, com índices que variam de 4,8% a 45%. As recomendações para a profilaxia e o controle da infecção por este organismo tem sido direcionadas no sentido de evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas que já tenham apresentado sintomatologia compatível ou mesmo, que tenham produzido filhotes infectados e doentes.

Não se trata, pois, de um agente patológico novo, mas sim, recentemente diagnosticado (possivelmente tenha sido diagnosticado, até o final da década de 80, como *T. gondii* devido à inespecificidade e similaridade dos sinais neurológicos causados pelos dois parasitos).

O presente trabalho teve como objetivos: (1) determinar a frequência dos portadores de *N. caninum* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro de origem de um CTI Veterinário; (2) determinar as possíveis variáveis associadas à infecção por *N. caninum* em cães criados em moradias localizadas em áreas urbanas na Barra da Tijuca, região metropolitana da Cidade do Rio de Janeiro, RJ.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Bjerkas et al., 1984 na Noruega, observaram um protozoário semelhante a *T. gondii* em cães com doença neurológica. Taquizoítos foram identificados no cérebro e músculos onde a presença de anticorpos anti-*T. gondii* não foi detectado no soro destes cães que também não responderam ao ensaio biológico em camundongos. A partir deste momento, um novo gênero, *Neospora*, com a espécie tipo *N. caninum* foi proposto como agente causador de doença neurológica em cães nos EUA por Dubey et al. (1988a). No mesmo ano, este organismo foi isolado em cultivo celular a partir de cães naturalmente infectados (DUBEY et al., 1988a) assim como, ocorreu o desenvolvimento do teste de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de *N. caninum* (DUBEY et al., 1988b). A partir daí, a neosporose passou a ser incluída no diagnóstico diferencial em cães quando estes apresentavam paresia de membros, encefalite e miosite (UGGLA et al., 1998).

Com o desenvolvimento do teste de imunistoquímica onde se utiliza anticorpos policlonais produzidos em coelhos (LINDSAY; DUBEY, 1989) foi facilitada a identificação deste agente etiológico nos tecidos de vertebrados. Neste mesmo ano, ocorreu o desenvolvimento de drogas anti-coccídicas, que passaram a ser utilizadas para inibição do desenvolvimento de *N. caninum* em células de cultura, sendo então, identificado como principal causador de abortos em bovinos em uma propriedade leiteira no Novo México por Thilsted e Dubey (1989) como também foi apontado como principal causador de abortos na Califórnia, EUA (ANDERSON et al., 1991).

O primeiro relato de isolamento de *N. caninum* em fetos bovinos abortados foi assinalado por Conrad et al. (1993). Neste mesmo ano, foram encontradas diferenças estruturais e histopatológicas entre *T. gondii* e *Neospora* spp. (DUBEY; LINDSAY, 1993).

Nos dois anos seguintes, Bjorkman et al. (1994) e Paré et al. (1995) desenvolveram a técnica do ELISA para o diagnóstico sorológico da neosporose canina e bovina.

Dubey e Lindsay (1996) observaram que casos mais graves de neosporose canina ocorriam em filhotes com infecção congênita, no entanto, animais de qualquer idade podem desenvolver clinicamente a doença. Os principais sinais observados foram alterações neuromusculares, que podem levar o animal a óbito. A neosporose clínica em cães já foi relatada em vários países, incluindo Estados Unidos, Canadá, Japão, Costa Rica, Uruguai, Austrália, Argentina, Nova Zelândia e Europa.

Filogeneticamente, *N. caninum* possui suas características ultraestrutural e filogenia próxima a de *Hammondia heydorni* (Tadros e Laarman, 1976) Dubey, 1977, além de terem o cão como hospedeiro definitivo e eliminar em suas fezes oocistos morfologicamente semelhantes e ser heteróxico obrigatório, o que não acontece em relação a *T. gondii* que tem felinos obrigatoriamente como hospedeiro definitivo e ser heteróxico facultativo. Algumas controvérsias aconteceram quanto à denominação de *N. caninum*, já, que Melhorn e Heydorn (2000) indicaram que esse protozoário deveria ser incluído em gêneros pré-existentes: *Hammondia* e *Toxoplasma*.

2.2 TAXONOMIA

Comparando as propostas de Cox (1981), Corliss (1994) e Cavalier-Smith, 1993 poder-se-á classificá-lo como:

Império: Eucariota Cavalier-Smith, 1993

Reino: Protozoa Owen, 1858

Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Sporozoazida Leukart, 1879

Subclasse: Coccidiasina Leukart, 1879

Ordem: Eucoccidiorida Léger e Doboscq, 1910

Subordem: Eimeriorina Léger, 1911

Família: Sarcocystidae Poche, 1913

Subfamília: Toxoplasmatinae Bioca, 1958

Gênero: *Neospora* Dubey et al., 1988

Espécie: *Neospora caninum* Dubey et al., 1988

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS

Neospora caninum possui uma grande variedade de hospedeiros. Sua estrutura e ciclo de vida são muito semelhantes ao do *T. gondii* com duas principais diferenças: a neosporose é primeiramente uma doença de bovinos, onde os cães e outros canídeos são hospedeiros definitivos deste coccídio, enquanto que a toxoplasmose é uma doença principalmente de humanos, ovinos, caprinos, e os felídeos são seus únicos hospedeiros definitivos.

2.3.1 Morfobiologia

Este coccídio apresenta três formas infectantes (ATKINSON et al., 2000): os taquizoítos, que é a forma de proliferação rápida, os cistos teciduais que se encontram cheios de bradizoítos e os oocistos (DUBEY et al., 1988a; McALLISTER et al., 1998).

Os cistos e os taquizoítos são encontrados nos hospedeiros intermediários, localizados principalmente no sistema nervoso central (DUBEY et al., 1988a; DUBEY et al., 1990; McALLISTER et al., 1998).

Os cistos se apresentaram redondos ou ovais, medindo até 107 μ m, com uma parede espessa medindo até 4 μ m (DUBEY; LINDSAY, 1996; SPEER et al., 1999), em seu interior são encontrados os bradizoítos que apresentam multiplicação lenta, e vão dar origem a cistos teciduais, que causam infecção latente no hospedeiro (JARDINE; DUBEY, 1992) mediram 6-8x1-2 μ m eram delgados contendo as mesmas organelas dos taquizoítos (DUBEY; LINDSAY, 1996; SPEER et al., 1999). Como estão localizados dentro do cisto tecidual possuem uma maior resistência à ação do suco gástrico. Os taquizoítos ovoides, redondos ou em forma de meia lua, medindo aproximadamente 3-7x1-5 μ m, de acordo com o estágio em que se encontrem (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2003). Estes têm sido identificados em diversos tipos celulares, incluindo células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (BJERKAS et al., 1984; SPEER; DUBEY, 1989; DUBEY et al., 1988a; DUBEY, 1993; DUBEY; LINDSAY, 1996; GONDIM et al., 2001). Estes cistos são observados no tecido nervoso, mas podem ser encontrados em tecido muscular de bovinos e cães naturalmente infectados com *N. caninum* (PETERS; SCHARES, 2001).

Os oocistos eram de forma esférica ou subesférica medindo 10-11 μ m (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999b), de parede lisa e incolor com espessura 0,6 a 0,8 μ m. No

seu interior possui dois esporocistos elipsoidais mediram 7,4-9,4 x 5,6-6,4 μ m (LINDSAY et al., 1999b; DUBEY et al., 2002), cada um deles contendo em seu interior quatro esporozoítos, com forma alongada e mediram 5,8-7,0x1,8-2,2 μ m e com morfologia semelhante ao bradizoíto e taquizoíto (DUBEY et al., 2002). Estes em condições ambientais favoráveis podem esporular dentro de 24 horas (LINDSAY et al., 1999a; DUBEY, 1999a). No entanto, pouco se sabe acerca das características biológicas dos oocistos de *N. caninum* e quanto tempo os mesmos podem permanecer viáveis no solo e causar infecção nos animais.

2.3.2 Ciclo de vida do *Neospora caninum*

A pesar de ainda não ser totalmente elucidado, este parasito é um Apicomplexa que necessita de dois hospedeiros, a semelhança em parte ao do ciclo de vida de *T. gondii*. A fase sexuada do parasito na mucosa intestinal do hospedeiro definitivo ainda não foi determinada.

McAllister et al. (1998) alimentaram quatro cães com tecidos de camundongos infectados experimentalmente com *N. caninum* na tentativa de comprovar que o hospedeiro tipo deste organismo era um carnívoro. Durante um período de 30 dias, as fezes desses animais foram examinadas, e, três dos quatro cães eliminaram oocistos em suas fezes, que esporularam após três dias e continham em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um. Os camundongos com genes nocauteados para expressão de interferon gama (INF γ) receberam os oocistos através de inoculação oral, e se tornaram infectados. Estes achados, foram confirmados por Lindsay et al.(1999a) que conseguiram induzir após alimentarem dois cães com tecido nervoso de camundongos contendo cistos de *N. caninum*, a eliminação de oocistos em suas fezes.

Neospora caninum tem como hospedeiros definitivos, identificados até o momento, o cão (*Canis domesticus*), o coiote (*Canis latrans*), o dingo (*Canis lupus dingo*), e, o lobo cinzento (*Canis lupus*), além de uma variedade de animais domésticos e silvestres como hospedeiros intermediários. Este protozoário apresenta três estágios evolutivos infectantes, sendo, os taquizoítos e bradizoítos, encontrados nos tecidos, e esporozoítos contidos nos oocistos que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (McALLISTER et al., 1998; DUBEY, 2003; GONDIM et al., 2004). Eles desempenham também o papel de hospedeiro intermediário, e se infectam quando se alimentam de placenta, membranas fetais ou órgãos de fetos abortados e infectados com taquizoítos ou bradizoítos (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1998; GONDIM et al., 2004), ingestão de cistos (polizóicos

repletos de bradizoítos) presentes principalmente no sistema nervoso central (DUBEY, 1999a) ou ainda ser infectado verticalmente durante a vida intrauterina (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os oocistos são eliminados não esporulados nas fezes e dependendo das condições de temperatura e aeração ambiental, possa esporular dentro de três a sete dias, quando o esporonte central se divide em dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, caso em que são infecciosos (DUBEY; LINDSAY, 1996). Nesta fase, estes oocistos são semelhantes ao de *T. gondii*. Ainda não se sabe se os cães eliminam oocistos por mais de um período na vida.

Como é um parasito intracelular, é capaz de invadir células nucleadas, sendo que esta penetração na célula do hospedeiro é realizada por invasão ativa e pode ocorrer após cinco minutos de contato do taquizoíto com a célula (HEMPHILL; GOTTSTEIS, 1996).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

2.4.1 Distribuição geográfica da Neosporose em cães

Em cães, a neosporose clínica já foi relatada em vários países no mundo, incluindo EUA, Canadá, Japão, Costa Rica, Uruguai, Austrália, Argentina, Nova Zelândia e Europa. Os casos mais graves de neosporose canina ocorreram em filhotes com infecção congênita (DUBEY; LINDSAY, 1996), porém sabe-se que animais de qualquer idade podem desenvolver clinicamente a doença. Os principais sinais observados são alterações neuromusculares, que pode levar o animal a óbito. Ainda, de acordo com os autores acima, *N. caninum* é transmitido com eficiência para bovinos, sendo que as principais vias de infecção para estes animais é a transferência do parasito da mãe para o feto, denominada de transmissão vertical ou congênita, assim como, a ingestão de alimentos contaminados com oocistos deste organismo denominado de transmissão horizontal ou pós-natal. Em fazendas, a presença de cães, mostrou ser um “fator de risco” para a transmissão horizontal do *N. caninum* para bovinos.

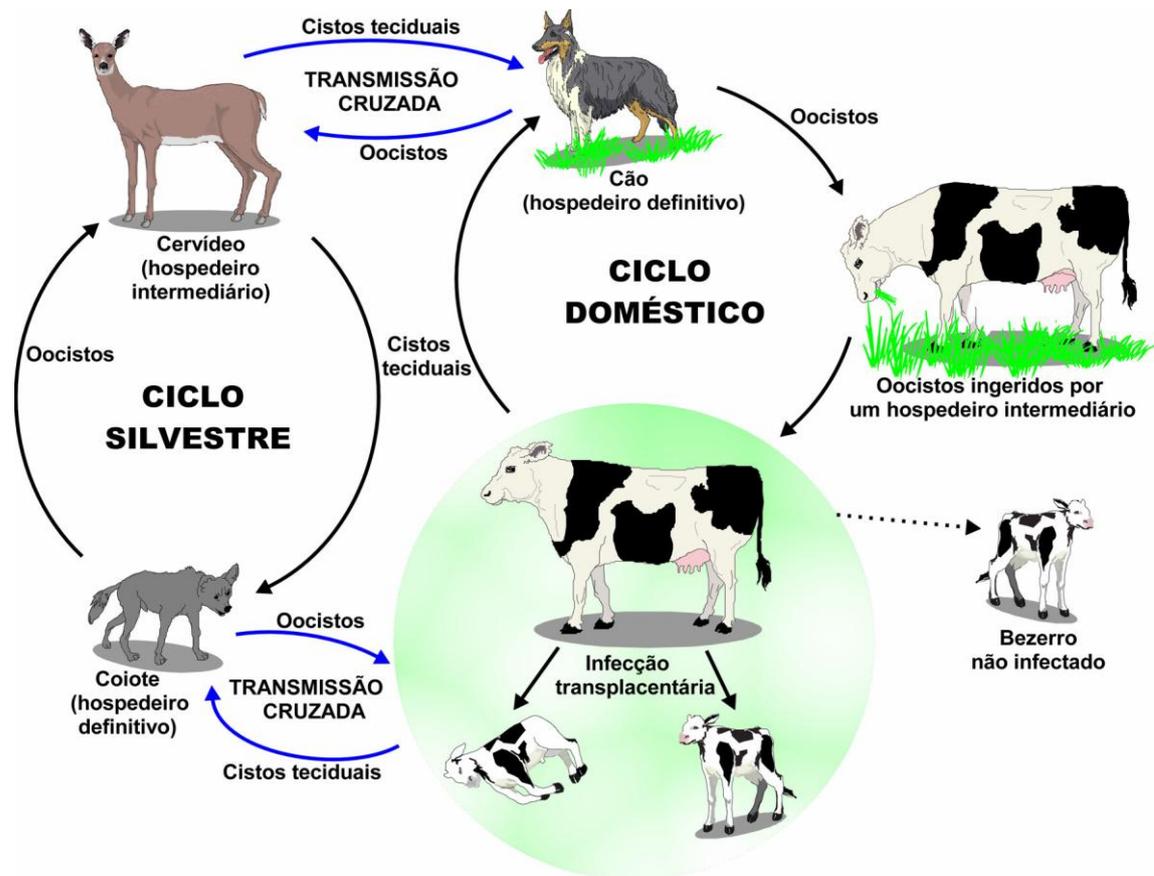


Figura 1. Ciclo de vida doméstico e silvestre de *Neospora caninum* incluindo os animais cuja participação no ciclo foi confirmada experimentalmente. (Cortesia: Dr. Luis F. P. Gondim).

Em termos epidemiológicos, a presença de cães em fazendas, mostrou ser um fator de risco para a transmissão horizontal do *N. caninum* em bovinos (PARÉ et al., 1998; SAWADA et al., 1998; WOUDA et al., 1999; DE SOUZA et al., 2012; DIJKSTRA et al., 2002; GUIMARÃES JR et al., 2006; CORBELLINI et al., 2006). Isso se deve ao fato de que animais nessas áreas possuem maior facilidade de contato com carne e vísceras infectadas, enquanto os cães domiciliados, criados em área urbana, são normalmente alimentados com rações comerciais. Mesmo assim, a frequência em cães é variável (DUBEY; LINDSAY, 1996). Entretanto, não se tem certeza se os cães eliminam nas fezes oocistos por mais de um período na vida.

Cães de qualquer idade podem desenvolver sinais clínicos da neosporose (DUBEY, 2003) e, em muitos casos, são hospedeiros assintomáticos (PASQUALI et al., 1998). A nível mundial, pode-se encontrar a infecção em cães, e o consumo de roedores, pássaros e outros animais (JESUS et al., 2006) podem servir de hospedeiro intermediário para este protozoário (WOUDA et al., 1999), como também, carnes mal cozidas ou comida caseira (CÃNON-FRANCO et al., 2003) e a ingestão direta dos oocistos esporulados.

De acordo com Gennari et al. (2002) e Fernandes et al. (2004) os animais com acesso a rua ou contato com outras espécies animais podem ser mais propensos a infecção de *N. caninum*, e, ainda de acordo com Fernandes et al. (2004) cães de áreas periurbanas apresentaram soroprevalência mais alta do que os de áreas urbanas.

Resultados sorológicos vêm demonstrando que cães oriundos de propriedades rurais apresentam maior soroprevalência quando comparados com cães de regiões urbanas e Peri-urbanas (SÁNCHEZ et al., 2003; FERNANDES et al., 2004). A forte associação epidemiológica entre a presença de cães soropositivos e a ocorrência de neosporose bovina indica que a transmissão via oocistos contribui para manter a infecção nos rebanhos (McALLISTER, 1998; SÁNCHEZ et al., 2003), contudo, o papel do cão na transmissão e manutenção da doença precisa ser mais estudado, devido à escassez de informações sobre a frequência e intensidade de eliminação de oocistos no ambiente por essa espécie.

Sicupira et al. (2012) realizaram estudo onde se confirmou que cães em áreas urbanas, rural ou peri-urbana no Nordeste do Brasil foram mais expostos a *N. caninum*. Foi constatado que as medidas de controle para prevenir a infecção dos cães na região deviam ser focadas principalmente no controle de acesso a potenciais fontes de infecção.

2.4.2 A importância da vida selvagem na dispersão de *Neospora caninum*

De acordo com Fayer (1980) a vida selvagem é de grande importância na transmissão de algumas espécies de coccídios, onde algumas espécies desses organismos podem se desenvolver tanto em animais domésticos como em silvestres; ficando assim, os animais silvestres como possíveis reservatórios desses parasitos quando houver áreas superpostas comuns ou mesmo, em alguns casos houver hospedeiros transportes ou mesmo vetores que sejam responsáveis por manter a infecção entre os dois grupos de animais.

Observa-se que além do cão doméstico (*C. lupus familiaris*) como hospedeiro definitivo dessa parasitose (McALLISTER et al., 1998), outros canídeos silvestres podem ser responsáveis pela eliminação de oocistos nas fezes como o coiote (*C. l. latrans*) (GONDIM et al., 2004) e do lobo cinzento (*C. l. lupus*) (DUBEY et al., 2011) sem contar da possibilidade de haver inúmeros hospedeiros intermediários na vida selvagem (SOBRINO et al., 2008).

2.4.3 A neosporose como fator zoonótico

Em humanos, ainda não foi encontrada evidências de que este agente etiológico seja responsável por doença em humanos e que consiga causar infecção (PETERSEM, 1999; GRAHAM, 1999), no entanto, já foi detectado anticorpos de *N. caninum* em pacientes positivos para HIV (LOBATO, 2006), enquanto que a suspeita em casos de abortos em humanos na Dinamarca estarem vinculados a sororreação a *N. caninum*, mas não foram confirmadas (PETERSEM et al., 1999).

2.5. ASPECTOS CLÍNICOS DA NEOSPOROSE

Os casos mais graves da neosporose ocorrem em filhotes jovens, infectados congenitamente, esses desenvolvem paralisia dos membros posteriores que avança em uma paralisia progressiva. Sinais neurológicos são dependentes do local parasitado (JAKSON et al., 1995). Os membros traseiros são os mais severamente afetados em relação aos dianteiros e, muitas vezes com hiperextensão rígida (CUDDON et al., 1992; BARBER; TREES, 1996; BARBER et al., 1995).

Outras disfunções, de acordo com Hay et al. (1990) são dificuldade de engolir, paralisia da mandíbula; flacidez muscular, atrofia muscular e insuficiência cardíaca.

A causa da hiperextensão dos membros posteriores ainda é desconhecida, mas provavelmente é devida a uma combinação da paralisia do neurônio motor superior e miosite que resulta em rápida contratura fibrosa progressiva dos músculos que pode provocar a fixação das juntas.

A infecção por via transplacentária em cães é bastante severa, caracterizando-se por encefalite, poliarticulite, polimiosite e paralisia dos membros posteriores (LINDSAY et al., 1999a). Isto ocorre porque o protozoário se reproduz, principalmente, nas células dos nervos cranianos e espinhais, o que leva a uma diminuição da condutividade das células parasitadas. Além disso, a neosporose atinge preferencialmente animais com até 12 meses de idade, acarretando paralisia do tipo ascendente nos membros posteriores, sem predileção por sexo ou raça (RUEHLMANN et al., 1995). Foram observadas dificuldade de deglutição, miocardite associada à morte súbita e pneumonia. Essa enfermidade pode ser localizada ou generalizada, com todos os órgãos envolvidos (BARBER; TREES, 1996) inclusive a pele, com severa dermatite (DUBEY et al., 1988a; DUBEY et al., 1995; BOYD et al., 2005).

Neosporose cutânea foi descrita em cães que apresentavam dermatite ulcerativa por Perl et al. (1998) em Israel, Poli et al. (1998) na Itália, Hornok et al. (2006) na Hungria e, na Austrália por McInnes et al. (2006) que isolaram *N. caninum* de lesão de pele em um cão. Embora a neosporose cutânea seja mais comum em animais adultos, pode ocorrer em cães de qualquer idade e a imunossupressão pode favorecer o aparecimento desta manifestação clínica da doença (BOYD et al., 2005; McINNES et al., 2006). Ainda, de acordo com Dubey e Lindsay (1996) enfermidades simultâneas não são comuns nos casos de neosporose, no entanto, a imunossupressão natural ou iatrogênica pode exacerbar a infecção.

Em 1990, Dubey et al., já haviam relatado a ocorrência de cistos de *N. caninum* em retina de quatro cães que adquiriram a doença por via congênita.

Patitucci et al. (1997) sugeriram que a neosporose clínica em animais adultos pode ocorrer em função da reativação de uma infecção anterior, associada com imunossupressão causada por vacinação com vírus atenuado. Durante a fase aguda da doença o parasito pode ser encontrado em vários órgãos (coração, pulmões e fígado) e, na fase crônica somente no sistema nervoso central (BARBER et al., 1996). Os casos fatais foram relatados em animais com oito a 15 anos de idade e, cadelas com infecção subclínica transmitiram para seus fetos em sucessivas gestações.

2.6 DIAGNÓSTICO

Deve ser feito de uma forma completa, e sempre que possível deve-se aliar exame *ante-mortem*, sorologia e outros exames laboratoriais, observação dos sinais clínicos, anamnese, e paralelamente analisar todo o histórico do cão. O somatório destes estudos se refletirá num diagnóstico verdadeiramente conclusivo.

2.6.1 Exame de fezes

Para auxiliar na identificação da eliminação dos oocistos pelo hospedeiro definitivo, pode-se utilizar o exame de fezes. No entanto, o diagnóstico parasitológico da neosporose no cão é extremamente difícil devido a falta de informações sobre a frequência e intensidade da eliminação de oocistos no ambiente, além da dificuldade de se distinguir entre as formas de *N. caninum* e *H. heydorni* eliminadas nas fezes do cão (HILL et al., 2001) somente pelos oocistos. Esta última elimina nas fezes os oocistos na maioria das vezes em grande quantidade (LOPES, 2013)*.

Para a pesquisa dos oocistos de *N. caninum* nas fezes dos hospedeiros definitivos, o método mais utilizado é o da centrifugo flutuação com solução saturada de açúcar (MCALLISTER et al., 1998; HILL et al., 2001; SCHARES et al., 2005).

2.6.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Devido à dificuldade na diferenciação entre *N. caninum* e *H. heydorni*, é necessário o emprego da técnica da PCR, fundamental para a detecção do DNA do parasito e a confirmação do diagnóstico definitivo (HILL et al., 2001).

Basso et al. (2001) isolaram das fezes de um filhote de cão com histórico de diarreia, oocistos de *N. caninum* através da técnica de flutuação em solução de açúcar, sendo este, o primeiro isolamento em um cão naturalmente infectado. Foram encontrados oocistos pequenos, semelhantes tanto aos de *Hammondia* como os de *Neospora*, que posteriormente foram confirmados nos EUA como sendo de *N. caninum*, através da PCR e inoculação em gerbis da Mongólia.

*LOPES, C.W.G., 2013 Comunicação pessoal.

Mesmo sendo fundamental em pesquisas realizadas em vários países como um método importante para o diagnóstico do *N. caninum*, a biologia molecular ainda não é empregada como rotina dos laboratórios devido ao elevado custo. O diagnóstico através da PCR se tornou o método para detecção de patógenos em estudos clínicos e epidemiológicos e, é hoje considerado um dos mais específicos nos diagnósticos com boa sensibilidade (HURCOVÁ et al., 2006).

2.6.3 Imunofluorescência (RIFI) e Elisa

Também podem ser diagnosticados através de provas sorológicas, empregando-se a reação de imunofluorescência indireta e o método ELISA, ambos de alta precisão (especificidade e sensibilidade). A identificação do anticorpo anti-*N. caninum* é um indicativo de que o animal foi exposto ao parasito.

De acordo com Paré et al. (1995) as provas sorológicas que permitem o diagnóstico da neosporose incluem o teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), testes imunoenzimáticos (ELISA), reações de polimerase em cadeia (PCR) e testes de aglutinação modificada para anticorpos de *N. caninum* (NAT).

Dubey et al. (1998a) relataram que os títulos de anticorpos em cães com neosporose clínica variaram de 1:50 até 1:3.200 no método da RIFI, e Reichel (1998) verificou títulos de 1:200 em cães clinicamente normais.

A RIFI foi o primeiro teste utilizado no diagnóstico da neosporose (DUBEY et al., 1988a). É o método de referência estabelecido para pesquisa de anticorpos contra *N. caninum*, sendo considerado como padrão para calibração e comparação com novos testes (BJÖRKMAN et al., 1999). Estudos realizados em diferentes espécies de hospedeiros têm demonstrado que existe pouca reação cruzada com outros parasitos coccídios, e um título igual ou maior a 25 indica exposição do cão com o agente (BJORKMAN; UGGLA, 1999).

Os cães podem excretar oocistos e apresentarem lesões compatíveis com a infecção, porém, sem soro conversão detectável, sendo assim, a sorologia negativa não confirma ser o cão livre da infecção por *N. caninum*, talvez, a característica da cepa possa influenciar a soroconversão (LINDSAY, 1999).

Testes hematológicos de rotina e a bioquímica do soro não são úteis em suportar um diagnóstico da neosporose, mas a atividade da creatinina-quinase pode ajudar na diferenciação entre uma miosite e uma paresia puramente neurológica. O que se observa é que

a sorologia ainda deve ser vista presuntiva porque a presença de anticorpos não é diagnóstica, porque muitos cães soropositivos permanecem saudáveis.

Recentemente, cistos foram observados entre miofibrilas esqueléticas em cães, além da miosite branda com infiltrações linfohistiocíticas (PETRERS et al., 2001). O isolamento foi realizado após a inoculação de fragmentos de cérebro de cão em gerbis da Mongólia, e a confirmação foi feita através da imunoistoquímica (IHQ) e PCR.

Um exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) pode indicar uma condição infecciosa ou inflamatória e a presença de taquizoítos no sedimento suportará um diagnóstico de encefalomielite protozoária (DUBEY et al., 1988a; BARBER; TRESS, 1966) e a presença de anticorpos anti-*N. caninum*, como também, a utilização de tecidos ou fluidos de fetos abortados ou bezerros infectados, acompanhados de amostra do soro materno (DUBEY; LINDSAY., 1996).

Lasri et al. (2004) realizaram teste para comparar três técnicas de diagnóstico sorológico para determinar a soroprevalência de *N. caninum*, utilizando o método ELISA ligado a uma enzima imunoabsorvente, em três populações de cães na Bélgica. Cães saudáveis, cães criados em fazendas de gado e cães urbanos com ou sem distúrbios neurológicos. O teste ELISA foi comparado com outros dois, sendo eles, a RIFI e o C-ELISA. Os resultados mostraram uma boa correlação entre a RIFI e a ELISA. Quando estes foram comparados com o C-ELISA, foi observado índices de concordância, positiva e negativa moderado. Foi constatado que no ELISA e na RIFI foi encontrada uma alta prevalência em cães de fazendas de gado, em relação às outras duas populações de cães. O resultado do teste mostrou que os sintomas neurológicos normalmente não são associados com a infecção por *N. caninum*. Os autores concluíram que o ELISA ligado a uma enzima imunoabsorvente poderia substituir o IFAT para o rastreamento de grande número de soro de cães.

Atualmente a sorologia para anticorpos anti-*N. caninum* é o teste diagnóstico mais empregado na identificação inicial de possíveis casos da doença. Porém, a presença de anticorpos isoladamente não é conclusiva no diagnóstico da neosporose, já que a maioria dos cães soropositivos permanece saudável. O exame considerado mais específico disponível atualmente é através da biologia molecular, que atua na detecção do DNA do protozoário nos tecidos dos hospedeiros intermediários e nas fezes dos hospedeiros definitivos (HILL et al., 2001; GONDIM et al., 2005).

.6.4. Histologia e imunoistoquímica (IHQ)

Através de exames histológicos e da IHQ, pode-se identificar taquizoítos e/ou cistos do *N. caninum* através de amostras de cérebro, medula espinhal, coração, fígado, músculo esquelético, pulmão, rim e placenta (SHIVAPRASAD et al., 1989; BARR et al., 1990; THORNTON et al., 1991; LINDSAY et al., 1993).

Em amostras do sistema nervoso central o exame histopatológico deve ser realizado, se baseando na observação de lesões sugestivas de neosporose e na presença de taquizoítos ou cistos teciduais.

No cérebro podem ser observados infiltrados celulares mononucleares, com ocasionais focos de necrose (DUBEY et al., 2005). Miocardites, miosites e hepatite não supurativa também podem estar presentes. A miosite da musculatura esquelética é caracterizada por necrose, infiltração de células mononucleares e vasculite, sendo mais frequente observada em membros pélvicos (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Após exame histopatológico realizado em um filhote da raça boxer com neosporose, Basso et al. (2001) encontraram encefalite multifocal não supurativa, com numerosas áreas de gliose focal associadas com malácia, e presença de taquizoítos e cistos teciduais próximos a essas áreas.

A biópsia muscular é considerada um teste fundamental para o diagnóstico da neosporose, assim como, a distinção entre a espessura da parede dos oocistos, pode auxiliar neste diagnóstico, uma vez, que *N. caninum* apresenta uma parede medindo $\geq 1\mu\text{m}$, enquanto que *T. Gondii* apresenta parede medindo em torno de $<0,5\mu\text{m}$ (DUBEY et al., 1998_a).

Neosporose foi diagnosticada por Martin et al. (2000) na Alemanha em filhotes de cão da raça Münsterländ com 11 semanas de idade, que apresentavam paralisia progressiva dos membros posteriores. Exames fisiopatológicos e imuno-histológicos revelaram a disseminação da infecção por *N. caninum*. Foram encontrados estágios do coccídio no cérebro, medula espinhal, retina, músculos, timo, coração, fígado, rins, suprarrenais, estômago e pele.

Os taquizoítos de *N. caninum* podem ser visualizados em tecidos, fluidos ou amostras citopatológicas e devem ser distinguidos de *T. gondii*, visto que, os taquizoítos de ambos os protozoários são similares estruturalmente à microscopia óptica. Entretanto, podem ser diferenciados por suas roptrias, já que estas são eletrodensas em *N. caninum* e eletrolucentes em *T. gondii* (DUBEY; LAPPIN, 2006).

2.7. FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM CÃES NO BRASIL

No Brasil, *N. caninum* foi diagnosticado a partir de 1999, em fetos abortados, e através de levantamentos sorológicos de bovinos e cães de diferentes estados, e descrito em cães por Gondim et al., em 2001 que isolaram pela primeira vez este protozoário de cão que possuía sinais indicativos da doença.

Nos últimos anos, em diversas regiões no mundo, vários estudos vêm sendo realizados sobre a presença de prováveis fatores de risco, associação entre soropositividade a *N. caninum* como idade, raça, sexo ou origem do cão e levantamentos de soroprevalência.

Varandas et al. (2001) investigaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* utilizando 295 soros de cães oriundos da região Nordeste do Estado de São Paulo, com intuito de correlacionar a presença de anticorpos com prováveis distúrbios clínicos.

Todas as amostras foram examinadas pela reação da RIFI para ambos os protozoários. Foram consideradas positivas as reações com recíprocas de títulos, igual ou maior do que 50 (*N. caninum*) e de 16 (*T. gondii*). As diluições sequenciais foram realizadas até que foi obtido o título sorológico final. Esses resultados puderam revelar que 25 (8,48%) e 151 (51,19%) dos soros examinados apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*, respectivamente. Em 17 soros (5,76%) foram detectados anticorpos para ambos os coccídios. Nos soros de 58 cães (19,66%) que apresentaram sintomatologia nervosa, foram detectados anticorpos em 04 (1,36%) para *N. caninum* e em 24 (8,14%) para *T. gondii*. Os resultados obtidos não revelaram correlação significativa ($P \geq 0,05$) entre a sorologia e a presença de neuropatias nos animais examinados.

Gennari et al. (2002) observaram soroprevalência de 40,1% em cães de rua (25/61) e de 20%, em cães com domicílio fixo, assim como, observou que os animais com acesso à rua ou contato com outras espécies animais podem ser mais frequentemente infectados com *N. caninum*, o mesmo observado por Fernandes et al. (2004).

No intuito de verificar a frequência de cães reagentes para *N. caninum* em São Luís, Maranhão, Brasil, Teixeira et al. (2006) coletaram amostras de sangue, por punção da veia radial, de 100 cães adultos (53 machos e 47 fêmeas), sem raça definida, capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses em São Luís, MA. Foi realizado o teste de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos para *N. caninum*. Consideraram-se positivas as amostras reativas no ponto de corte 1:50, conforme técnica descrita por Dubey et al. (1988a). Do total de amostras séricas, 45 foram positivas, sendo 60%

de machos e 40% de fêmeas. Não houve diferença de frequência quanto ao sexo. Os títulos de anticorpos para *N. caninum* variaram de 1:50 a 1:800. Observou-se elevada frequência de cães soropositivos (31,1%), com título de 1:50. Este foi o primeiro registro no estado do Maranhão. Essas observações poderiam explicar a alta prevalência detectada neste estudo, desse modo, cães de rua poderiam desempenhar importante papel epidemiológico na disseminação de *N. caninum*. Neste mesmo ano, Jesus et al. nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, na Bahia, Brasil, verificaram a frequência de anticorpos IgG anti- *N. caninum* em 415 amostras séricas de cães domiciliados e errantes, utilizando a RIFI (1:50). Foi encontrado anticorpos da classe IgG anti-*N. caninum* em 13,3% (22/125) dos animais domiciliados e em 11,2% (28/250) dos animais errantes. Em relação à frequência de animais soropositivos de machos e fêmeas foram 8,0% (6/75), e 18,4% (14/76) em cães domiciliados e 12,6% (17/135) e 9,6% (11/115) nos errantes respectivamente. Quanto à idade e sexo, raça e frequência de soropositividade ao *N. caninum* não foi observada diferença significativa entre os dois grupos estudados.

Até o ano de 2008, o estado de Goiás ainda não havia registrado infecção por *N. caninum* em seus cães. Neste ano, Boaventura et al. realizaram estudo para determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães errantes capturados pelo Centro de Zoonoses e domiciliados da cidade de Goiânia utilizando a técnica da RIFI. Do total de cães examinados, 32,9 % (65/197) mostraram-se positivos no teste de RIFI, com títulos de 1:50. Entre os 72 animais provenientes do Centro de Zoonoses de Goiânia, 36,1 % (26/72) apresentaram resultados positivos e entre os 125 cães domiciliados atendidos por hospitais veterinários, 31,2 % (39/125) foram positivos para *N. caninum*.

Bresciani et al. (2008) realizaram trabalho sobre a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* e *T. gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba, SP. Eles determinaram a presença desses coccídios através de uma amostra de 108 cães em 63 domicílios e canis da zona urbana por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para se verificar possíveis associações entre a presença de anticorpos contra os referidos coccídios e a variável raça, sexo, idade, dieta, ambiente, presença de gatos e acesso às ruas. Também foi realizada uma análise de fatores de risco com as variáveis mais associadas à infecção por *T. gondii* e *N. caninum*. Dos 63 locais amostrados, 28 (44,4%) foram soropositivos para *T. gondii* e 15 (23,8%) para *N. caninum*. Foi verificada associação entre cães positivos para *T. gondii* e criados em ambiente de terra ou gramado ($p < 0,001$), quando comparados aos mantidos em ambiente cimentado. A presença de um dos agentes não apresentou associação com a

ocorrência simultânea do outro coccídeo ($p = 0,84$).

Em 2008, Moraes et al. estudaram a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo, e sua associação ao sexo, idade e procedência quanto à zona urbana (exclusivamente cidade), rural (somente chácaras e sítios) e peri-urbana (acesso à zona urbana e rural) dos cães estudados. Novecentos e sessenta e três cães foram selecionados aleatoriamente, com ou sem raça definida, de ambos os sexos e de diferentes idades, sem apresentarem sintomatologia clínica. O trabalho foi realizado no período de maio a setembro de 1998. Os soros foram avaliados por meio da RIFI utilizando como antígeno a cepa padrão NC-1 de *N. caninum*. Foram reagentes 245 animais (25,4%), sendo 161 machos (27,5%) e, 84 fêmeas (22,3%). Dos 223 animais da zona urbana (25,8%), 11 da zona rural (16,9%) e 11 da zona mista (33,3%) foram reagentes a prova da RIFI. Os 11 municípios estudados apresentaram cães positivos com valores de ocorrência entre 8,9 a 53,5%. Foi observado neste estudo que animais com até um ano de idade (16,2%) apresentaram o percentual menor, quando comparados aqueles entre um a quatro anos (28,4%) e, os superiores há quatro anos (28,0%), sendo que estes dois grupos não apresentaram diferença significativa entre si. Ficou evidenciada neste estudo a ampla distribuição do agente na região.

Ainda em 2008, Fridlund-Plugge et al. detectaram anticorpos anti-*N. caninum* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em cães errantes e domiciliados das áreas urbana, Peri-urbana e rurais de Curitiba, estado do Paraná. Do total de 556 cães, 18,17% (101) foram soropositivos para *N. caninum* (título de 1:50). A frequência de anticorpos foi de 12,71% nos cães urbanos, de 15,73% nos peri urbanos e de 25,38% nos cães rurais. Nos cães rurais a frequência de anticorpos foi maior do que nos cães urbanos ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as frequências de anticorpos dos cães urbanos e Peri urbanos ($p > 0,05$), e dos Peri urbanos e rurais ($p > 0,05$). Os anticorpos anti *N. caninum* foram detectados em 34 de 233 cães domiciliados (14,59%) e em 17 de 126 cães errantes (13,49%). Não houve diferença estatística significativa entre o tipo de criação e a origem ($p > 0,05$). Os autores concluíram que *N. caninum* está presente nos cães urbanos e peri urbanos de Curitiba e nas áreas rurais do Estado do Paraná.

Magalhães et al. (2009) determinaram a frequência de cães soropositivos para *N. caninum*, no município de Ilhéus, BA, e a influência da procedência dos cães com soropositividade. Amostras de sangue de 161 animais foram coletadas, e testadas por meio da reação de imunofluorescência indireta, empregando-se um ponto de corte de 1:50. Dezenove (11,8%) cães soropositivos para o parasito foram detectados, sendo que, entre os positivos,

21,9% eram errantes e 9,3% domiciliados ($p = 0,1$). Observou-se que os animais residentes em áreas urbanas apresentaram uma maior soropositividade para o parasito quando comparados com os animais da área periurbana ($p=0,03$). Os resultados são indicativos da presença de *N. caninum* na região estudada.

Trabalho realizado por Caetano et al. (2012) objetivou verificar a prevalência de anticorpos classe IgG para *N. caninum* em cães e os fatores de risco na área urbana do município de Porto Alegre- RS, utilizando a RIFI e aplicação de questionário epidemiológico com os responsáveis pelos animais. Os animais foram divididos em três grupos: animais domiciliados, errantes e de criatórios comerciais. A frequência de anticorpos foi de 13,84% (36/260) de amostras positivas. Os títulos sorológicos observados variaram de 50 (44%) a 3200 (3%). Os dados obtidos no questionário foram analisados pelo Teste Exato de Fisher, e observou-se associação entre a positividade e os fatores alimentação e acesso a rua, com maior positividade para os animais que tinham acesso a rua ($p\leq 0,001$) e recebiam alimentados com comida caseira. Os fatores idade, sexo e contato direto com outros cães não apresentaram diferença significativa em relação à positividade dos animais.

Estudo prospectivo para conhecer a frequência real e a importância de *N. caninum* como causador de lesões e doença clínica em cães da região sul de Minas Gerais foi realizado por Nogueira (2012) sendo efetuado em duas etapas, onde na primeira, foi determinada a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e foram investigados os fatores de risco relacionados à sorologia em cães de zona urbana e rural de propriedades com diferentes atividades econômicas (produção de leite ou café). Para tanto, 703 amostras de sangue foram coletadas. O soro obtido foi analisado para anticorpos anti-*N. caninum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta ($RIFI\geq 1:50$). Dos 703 cães, 80 (11,4%) foram positivos para *N. caninum*. Cães que não recebiam ração industrial, de áreas rurais, de propriedades leiteiras principalmente com histórico de aborto bovino, que eram utilizados para caça, que apresentaram histórico de distúrbios reprodutivos apresentaram maiores chances de soropositividade ($P\leq 0,05$). Na segunda parte do estudo, 104 cães com sinais neurológicos e muscular ou histórico de doenças ou terapias imunossupressoras recente foram necropsiados e avaliados histopatologicamente a procura de lesões compatíveis com a infecção por protozoários. Lesões, como encefalite, miosite e miocardite não supurativa foram encontradas em 47 cães (45,2%).

Estudo similar foi realizado por Brinker no ano de 2012, com a finalidade de determinar a prevalência de anticorpos para *N. caninum* em cães de áreas urbanas e rural do

município de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Amostras de soro de 313 cães de origem urbana e rural foram testadas para a presença de anticorpos de *N. caninum* mediante a RIFI ($\geq 1:50$). Na área urbana a prevalência foi de 2% (5/160) e na rural de 12% (36/153) ($P \leq 0,001$). Os títulos sorológicos variaram de zero (86,9%) a 1:6400 (0,64%) sendo 1:50 (5,11%), o mais prevalente entre os positivos. Nenhum dos cães examinados apresentou sinais clínicos da neosporose durante a coleta de sangue. Dos fatores de risco avaliados, a idade dos cães rurais foi o único significativo ($P=0,0053$), com prevalência de 1% (2/34) entre aqueles com menos de um ano de idade e de 22% (34/119) entre os maiores de um ano de idade. Quanto aos fatores gênero, alimentação, confinamento, contato com bovinos e recolhimento de carcaças, os cães rurais não apresentaram diferença significativa em relação a soropositividade. Nos cães urbanos, os fatores gênero, alimentação e idade não apresentaram diferença significativa em relação à soropositividade. Ficou demonstrado neste estudo, que cães de área rural de Caxias do Sul foram mais predispostos à infecção por *N. caninum*, principalmente animais com mais de um ano de idade, e que nos animais de área urbana o coccídio se fez presente. Ainda neste mesmo ano, Teixeira et al. realizaram trabalho sobre a soroepidemiologia de *N. caninum* em cães de área urbana no município de Porto Alegre-RS, tendo como objetivos: verificar a prevalência de anticorpos classe IgG para *N. caninum* em cães através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) e avaliar os fatores de risco relacionados com o manejo e características individuais dos animais, através de questionário epidemiológico. Eles trabalharam com três grupos de cães: domiciliados ($n= 145$); errantes ($n= 70$) e de criatórios comerciais ($n=45$). A frequência de anticorpos total foi 13,84% (36/260) e entre os grupos foi de 15,8% para domiciliados, 17,1% para errantes e 2,2% para cães de criatório comerciais. Os títulos sorológicos observados variaram de 50 (44%) a 3200 (3%). Observou-se associação entre a soropositividade e os fatores alimentação ($p < 0.001$) e origem dos cães.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO

3.1.1 Animais de Estudo

As amostras utilizadas faziam parte da soroteca oriunda das coletadas dos cães atendidos no Centro de Terapia e Emergência Veterinária Ltda (CTI Vet. Clínica 24 horas), durante um período de 18 meses, situado na Avenida das Américas, 3939 bloco 2 loja I, na Barra da Tijuca, região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ cedidas gentilmente por seu proprietário (Anexo 1). Estabelecimento referência em atendimento clínico, cirúrgico e diagnóstico, em todo animal atendido na rotina clínica. Todos os animais do estudo possuíam responsáveis e acompanhamento médico veterinário de rotina, todas as coletas foram realizadas com o objetivo de diagnóstico, monitoração orgânica e metabólica, independente de sexo, raça, idade, assim sendo, com o objetivo de diagnóstico e tratamento compatível, foram utilizados os exames complementares pertinentes a cada caso, esgotando todos os recursos de diagnóstico disponíveis. Este trabalho atendeu aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de material procedente de animais atendidos e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal, sendo aprovado pela CEUA/IV/UFRRJ com o número nº 044/2014 (Anexo 2).

3.1.2 Avaliação Clínica e Conduta Clínica

Os animais eram atendidos por médico veterinário, que preenchiam ficha clínica e de cadastro (Anexo 3 e 4), eram solicitados exames conforme a necessidade e pertinentes ao quadro clínico para obtenção do(s) diagnóstico(s), com a utilização de serviços terceirizados caso necessário: patologia clínica, de imagem (ultrassonografia, radiografia, tomografia),

biológicos (cultura, antibiograma), sorológicos (pesquisa de antígeno ou anticorpo), dosagens hormonais, anatomopatológico (citológico, histopatológico), além de contar com o diagnóstico terapêutico, com objetivo de tratamento eficaz, clínico e/ou cirúrgico.

3.1.3 Determinação do Número de Amostras e Aplicação do Questionário

O cálculo da amostra foi realizado pelo programa EPI INFO 2003 (www.cdc.gov), baseado no estudo realizado previamente por Mineo et al. (2001) e Guimarães et al. (2009) totalizando um número de amostras de pelo menos 236 animais com 95% IC. A ficha clínica dos cães utilizados nesta pesquisa encontra-se nos anexos 3 e 4.

3.1.4 Coleta, Processamento e análise das amostras.

As amostra de sangue de um total de 402 foram coletadas da veia jugular direita ou esquerda, em seringa descartável, com agulha 25 x 7 mm. A seguir, 2 a 3 mL, conforme volume total da coleta foi acondicionado em tubo de ensaio pediátrico com ácido etilenodiaminotetracético (anticoagulante-EDTA), e o restante em tubo de ensaio seco com capacidade para 10 mL, sem anticoagulante. Com o material da própria seringa foram feitos dois estiraços sanguíneos corados utilizando conjunto para coloração rápida em hematologia^a As amostras de sangue foram processadas, com a utilização de aparelho automático^b para leucometria e eritograma. Para separação dos elementos figurados e plasma foi confeccionado microhematócrito e utilizado a microcentrifuga^c, assim como a confecção de dois estirões de concentrado de plaquetas e leucócitos em lâminas de vidro, obedecendo à mesma técnica de fixação, desidratação e coloração para o estiraço sanguíneo, ambos observados em microscópio binocular^d para contagem específica de leucócitos, morfologia dos elementos figurados e presença de hematozoários. Foi utilizado um refratômetro clínico manual^e para mensuração da proteína plasmática total.

As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas^f a 350 xg por 10 minutos, para separação do soro e a seguir, foi acondicionadas em criotubos de 2,5 mL, em duplicatas, identificadas e armazenadas a temperatura de -20° C até a realização da RIFI e mensuração da albumina e globulina.

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.2.1 Processamento do Soro Sanguíneo

Os soros em duplicatas foram levados ao Laboratório de Coccidios e Coccidioses (LCC) – Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km7, Bairro Ecologia, Seropédica, RJ, em uma caixa isotérmica para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, utilizando o teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Para a determinação das frações de proteína foi utilizando o método colorimétrico através de reagentes específicos^g e leitura em analisador semiautomático, **para** albumina (g/dL) e globulina (g/dL), conforme orientação do fabricante.

3.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A avaliação sorológica para *N. caninum* foi através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta com base em Coelho (1996) e Ueno (2005).

3.2.2.1 Obtenção do material utilizado para identificação dos animais sororreagentes para *Neospora caninum*

As lâminas para RIFI foram procedentes do Laboratório IMUNODOT localizado no município de Jaboticabal, SP e mantidas em temperatura de -20 °C no LCC, Departamento de Parasitologia Animal, Anexo um do IV, UFRRJ até o seu uso.

3.2.2.2 Diluição dos Soros Caninos

Os soros dos cães, incluindo os controles positivo e negativo, foram diluídos a 1:50 em PBS, com a confecção de 32 µL de cada respectivo soro. Em seguida 10 µL das respectivas amostras previamente diluídas foram instilados nos poços da lâmina de RIFI, já previamente sensibilizada com antígeno, taquizoitos de *N. caninum*. As lâminas foram incubadas em câmara úmida em estufa^k a 37° C por 30 minutos, posteriormente lavadas em PBS com auxílio de agitador de Kline^l em velocidade moderada, durante cinco minutos, desprezar o PBS e repetir o procedimento. Secar as lâminas em estufa^k a 37° C por tempo suficiente para receber a solução de conjugado.

3.2.2.3 Preparação do Conjugado

O conjugado anti-cão^m foi diluído conforme o fabricante, a 1:32 em PBS pH 7,2 contendo azul de Evans a 0,5%, instilar 10 µL nos respectivos poços já secos das lâminas, incubar em estufa^k a 37° C em câmara escura e úmida por 30 minutos, posteriormente lavadas em PBS com auxílio de agitador de Kline^k em velocidade moderada, durante cinco minutos, desprezar o PBS e repetir o procedimento. Secar as lâminas em estufa^k a 37° C por tempo suficiente para secagem. Todo o procedimento deve ser em ambiente protegido de luz.

3.2.3 Leitura da Reação de Imunofluorescência Indireta

A leitura foi feita em microscópio binocular de fluorescênciaⁿ com aumento de 400X, sendo considerados positivos os animais em que o respectivo poço apresentava taquizoitos com fluorescência periférica total (Figura 1) e homogênea, e negativa os poços que apresentavam taquizoitos com fluorescência parcial ou apical (Figura 2), esses resultados eram validados com os respectivos controles positivo e negativo.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a associação entre as variáveis estudadas, foram utilizados os testes estatísticos do Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates ou teste exato de Fisher quando recomendado (SAMPAIO, 1998).

Para a regressão logística foi utilizado também o programa EPI INFO 3.5.1 (DEAN; ARNER 2008) Epi Info (www.cdc.gov).

O modelo final foi construído pela retirada das variáveis (modelo *backward*) de acordo com os valores de *p* ajustado pelo teste de Hosmer & Lemshow, devendo cada variável ter nível de significância de 5% para permanecer neste modelo.

Foram calculadas as Chances de ocorrer (*Odds Ratio*) da análise bivariada com medidas de associação e intervalo de confiança de 95%.

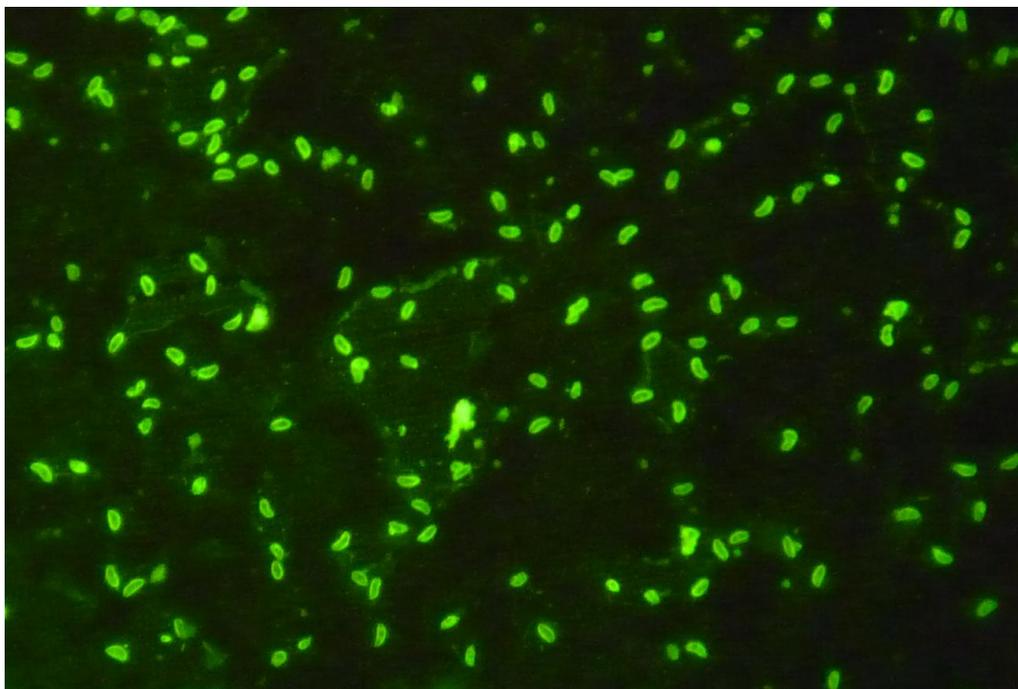


Figura 2. Taquizoitos de *Neospora caninum* com fluorescência periférica total a RIFL.
Obj. 40 X.

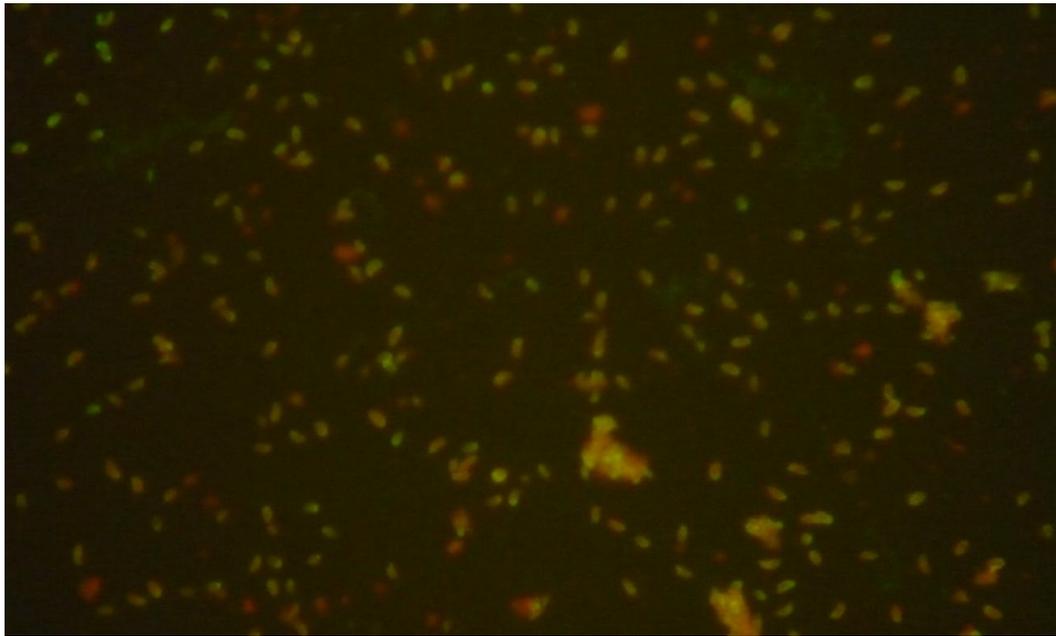


Figura 3. Taquizoitos de *Neospora caninum* com fluorescência parcial ou apical a RIFL.
Obj. 40 X

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COMO TESTE DE DIAGNÓSTICO

Os estudos relacionados com o tema da tese demonstraram que através da RIFI, foram observados anticorpos contra *N. caninum* em 8,46% (34/402) dos animais. O percentual de animais positivos foi bem variado (DUBEY; LINDSAY, 1996; RASMUSSEN; JENSEN, 1996; SAWADA et al., 1998; PATITUCCI et al., 2001; HORNOK et al., 2006; REITEROVÁ et al., 2009), inclusive em diferentes regiões do Brasil. Souza et al. (2002) no Paraná observaram 21,6% dos cães da área rural; Azevedo et al. (2005) observaram 8,4% do cães de Campina Grande, PB; Cunha Filho et al. (2008) em Pelotas, RS, 5,5% (6/109) nos cães urbanos; na região da Serra de Botucatu, SP, Moraes et al. (2008) observaram 25,8%, enquanto que Benetti et al. (2008) em Cuiabá, MT, detectaram a presença deste agente etiológico em 45% dos animais. Apesar da grande variação observada entre os animais sororreagentes a *N. caninum*, este trabalho está de acordo com os observados anteriormente por Mineo et al. (2001) e Guimarães et al. (2009) em cães atendidos em Hospitais Veterinários das localidades de Uberlândia e Lavras, ambas em Minas Gerais. A semelhança deles, as amostras utilizadas também foi procedente de cães atendidos em uma Clínica Veterinária. Estes animais também tinham assistência veterinária no decorrer de suas existências o que provavelmente tenha influenciado na possibilidade de adquirirem infecção natural de *N. caninum* na região estudada.

4.2 O CÃO E A POSITIVIDADE PARA *Neospora caninum* NA BARRA DA TIJUCA

As amostras encontradas foram relacionadas com as condições de vida e manejo, referentes à idade, moradia, contato com outros animais, hábitos

alimentares, sexo dos animais e porte dos animais conforme informações apresentadas por seus proprietários.

4.2.1 Faixa etária e suas consequências

Dos 402 animais avaliados neste estudo, a idade se mostrou como um fator predisponente, pois quanto mais velhos os animais mais susceptíveis a exposição ao patógeno (Tabela 1) e, dentre os positivos, apenas dois dos animais tiveram sinais clínicos neurológicos da doença. Apesar da baixa frequência encontrada para *N. caninum*, esta aumentava com a idade dos cães clinicamente avaliados. Situação semelhante foi observada com sintomatologia nervosa por Mineo et al. (2001) e Souza et al. (2002) no Paraná 21,6% (29/134) em cães da área rural. Andreetii et al. (2006) em Campo Grande, MS, com 27,2%, Aguiar et al. (2006) Amazonas, com 12,6%, Moraes et al. (2008) em Botucatu, SP, observaram 25,8%, Guimarães et al. (2009) em Lavras, MG com 3,1%. Cunha Filho et al. (2008) em Pelotas, Rio Grande do Sul 5,5% (6/109) nos cães urbanos e Brinker et al. (2012) em Caxias do Sul, RS com 22%.

Tabela 1. Importância da faixa etária em cães sororreagentes a *Neospora caninum* na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ.

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^b
	Sorologia ^c	Valores			
3 meses – ≤10 anos	Negativa:	249 (62) ^d	0,0221	1,082	1,007 a 1,162
	Positiva:	16 (4)			
>10 – 19 anos	Negativa:	119 (30)			
	Positiva:	18 (4)			
Total		402 (100)			

^aRR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem

4.2.2 Influência da Moradia

A moradia em apartamento foi um significativo fator de proteção contra a infecção por *N. caninum* em relação a outros tipos de moradia que esses cães tinham acesso à rua quando levados com guia pelos proprietários, e o fato de morarem em apartamento, vem a ser um fator de proteção contra este patógeno (Tabela 2). A moradia diferente de apartamento se refere ao habitat onde oferece ao animal a possibilidade de ter um espaço onde à comida e água, servidas como alimentação favorece a infecção, pois animais, tais como pequenos roedores e pássaros, que vem a procura de comida e água, podem servir de presa e com isso favorecer a infecção por carnivorismo, pela ingestão de cistos de *N. caninum*, resultado semelhante ao encontrado por Sicupira et al. (2011). Mesmo em áreas urbanas não se observou diferenças entre animais domiciliados e errantes (JESUS et al., 2006). Situação semelhante foi também observado por Boaventura et al. (2008); no entanto, os atendidos em hospitais veterinários foram maior número 31% (39/125) do que nos animais observados neste trabalho. Além disso, mesmo em moradias, onde o piso do quintal era de grama ou de cimento foi significativo quando associado a animais sororreagentes a *N. caninum* (BRESCIANI et al., 2008). O que se observa é que o tipo de moradia, principalmente naquelas onde se observa a presença de áreas abertas a infecção torna-se mais frequente.

Tabela 2. Importância da moradia na infecção natural de cães por *Neospora caninum*.

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	RR ^a	IC 95% ^a
	Sorologia ^b	Valores			
Apartamento	Positiva:	19 (5) ^c	0,0005	2,879	1,630 to 5,084
	Negativa:	264 (66)			
Outros	Positiva:	23 (5)			
	Negativa:	96 (24)			
Total		402 (100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^c Valores relativos em percentagem

4.2.3 Presença de outras espécies animais

Situação esta relatada previamente por Bresciani et al. (2008). Em virtude deste agente etiológico ser heteroxeno obrigatório a única possibilidade dos cães adquirirem infecção seria por via transplacentária, carnivorismo ou com oocistos esporulados no meio ambiente em que vivem. A infecção se torna mais importante para cães de áreas rurais, que podem ter hábito de comer restos placentários e fetos abortados de animais de produção, principalmente bovinos (FRIDLUND-PLUGGE et al., 2008). No presente trabalho, a não significância (Tabela 3) pode estar relacionada a serem animais de domicílios onde, se houver outros animais a chance de contaminação seria mínima, dada a procedência de serem de áreas urbanas, cujo domicílio em que vivem não favoreceria a transmissão entre eles.

Tabela 3. Importância da convivência com a presença de outros animais na infecção natural por *Neospora caninum* em cães.

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^a
	Sorologia ^b	Valores			
Presença	Positiva:	1 (0) ^c	1,0000	1,0269	0,9010- 1,1704
	Negativa:	15 (4)			
Ausência	Positiva:	29 (8)			
	Negativa:	304 (87)			
Total		349(100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^cValores relativos em percentagem

Obs: 53 animais sem informações.

4.2.4 Hábitos alimentares

Quanto à variável alimentação (Tabela 4), não houve uma maior soropositividade nos cães que se alimentavam de dieta caseira em comparação com os alimentados por ração neste trabalho, concordando com os resultados encontrados por Souza et al. (2002) em Alagoas e Benetti et al. (2008) em Mato Grosso e Brinker (2012) em Caxias do Sul, RS. Entretanto, resultados significativos foram observados por Caetano et al. (2012) quando cães foram alimentados com comida caseira, observação esta mais relevante em Porto Alegre, RS (TEIXEIRA et al., 2012). Provavelmente, esta última esteja relacionada ao hábito dos cães comerem aparas de carne, ou carne mal passada, oriundas de churrascos, hábito cultural na região estudada.

Tabela 4. Importância da alimentação na infecção natural por *Neospora caninum* em cães.

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^a
	Sorologia ^b	Valores			
Industrializado (ração)	Positiva: Negativa:	12 (3) ^c 179 (46)	0,2001	0,6283	0,3158 – 1,250
Não industrializado (comida caseira)	Positiva: Negativa:	20 (5) 180 (46)			
Total		391 (100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^cValores relativos em percentagem

4.2.5 Sexo e suas consequências

Não houve diferença estatística quanto à variável sexo (Tabela 5) embora nesse estudo, observou-se um maior número de machos 21 /191 que fêmeas 13/177 sororreagentes. Este resultado corrobora com os encontrados por Jesus et al. (2006) na Bahia; Cañón-Franco et al. (2003) e Aguiar et al. (2006) no Amazonas; Andreotti et al. (2006) em Campo Grande, MS; Moraes et al. (2008) em Botucatu, SP; Teixeira et al. (2006) em São Luís, MA; Lopes et al. (2011) no Piauí; Boaventura et al. (2008) Goiania, GO; Cunha-Filho et al. (2008) RS e Wouda et al. (1999) na Holanda, não indicando a ocorrência preferencial da infecção a um determinado sexo, indicando que machos e fêmeas possuem o mesmo risco de se infectar com este agente etiológico. O que justifica a não significância observada neste trabalho.

4.2.6 Porte dos Animais e a sororreação a *Neospora caninum*

Em relação ao porte dos cães, estes foram divididos entre pequenos, médios e grandes (Tabela 6), o que se observa a independências entre estas variáveis, onde o porte dos animais poderia ser considerado fator de risco na infecção natural por *N. caninum*.

Os animais de pequeno porte (Tabela 7) se mostraram com maior fator de proteção com valor de $p = 0,0169$. Este resultado indica que houve significância quanto ao porte dos animais, e, entre os cães de pequeno porte, ocorre um percentual crescente de positividade, com maior fator de proteção para esses animais no presente trabalho. Bresciani et al. (2007), também avaliaram a associação com o porte dos cães, porém não observaram significância para essa comparação. Entretanto, não se observaram significância entre cães sororreagentes para *N. caninum* nos cães de porte médio (Tabela 8) e grande (Tabela 9) no presente trabalho.

Tabela 5. Importância do sexo na infecção natural por *Neospora caninum* em cães.

Características	Animais		Valor de p	RR^a	IC 95% ^a
	Sorologia ^b	Valores			
Machos	Positiva:	21 (5) ^c	0,2874	1,448	0,7456 to 2,811
	Negativa:	191 (48)			
Fêmeas	Positiva:	13 (3)			
	Negativa:	177 (44)			
Total		402(100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^c Valores relativos em percentagem

Tabela 6. Importância do porte dos animais sororreagentes a *Neospora caninum*

Características	Animais		Valor de p	χ^2
	Sorologia ^a	Valores		
Pequenos	Negativa:	223	0,0359	6,6556
	Positiva:	13		
Médios	Negativa:	69		
	Positiva:	9		
Grandes	Negativa:	76		
	Positiva:	12		
Total		402 (100)		

^a RIFI

Tabela 7 Importância dos cães de pequeno porte entre os animais sororreagentes a *Neospora caninum*

Características	Animais		Valor de <i>PPP</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^b
	Sorologia ^c	Valores			
Pequeno	Negativa:	223 (55) ^d	0,0169	0,4354	0,2244 – 0,8448
Pequeno	Positiva:	13 (3)			
Outros	Negativa:	145 (36)			
Outros	Positiva:	21 (5)			
Total		402 (100)			

^aRR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem

Tabela 8. Importância dos cães de médio porte entre os animais sororreagentes a *Neospora caninum*

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^b
	Sorologia ^c	Valores			
Médio	Negativa:	69 (17) ^d	0,2640	1,495	0,7273– 3,075
Médio	Positiva:	9 (2)			
Outros	Negativa:	299 (74)			
	Positiva:	25 (6)			
Total		402(100)			

^aRR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem

Tabela 9. Importância dos cães de grande porte entre os animais sororreagentes a *Neospora caninum*

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	RR ^a	IC 95% ^b
	Sorologia ^c	Valores			
Grande	Negativa:	76 (19) ^d	0,0798	1,946	1,003 – 3,776
	Positiva:	12 (3)			
Outros	Negativa:	292 (73)			
	Positiva:	22 (5)			
Total	402 (100)				

^aRR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem

Apesar de não haver citações mais concretas sobre estas variáveis e animais sororreagentes a *N. caninum*, pode-se inferir que os de pequeno porte são mais protegidos quanto à infecção por viverem em sua maioria em apartamentos em bairros de áreas urbanas com menos chances de adquirirem a infecção natural por *N. caninum*.

4.2.7 Contato com ambiente externo a moradia (rua)

Neste estudo (Tabela 10), o acesso à rua foi um fator não predisponente a infecção ao patógeno, resultado similar ao observado por Fridlund-Plugge et al. (2008), em Curitiba. Diferente do encontrado por Azevêdo et al. (2005) em Campina Grande, PB, Benetti et al. (2008) em Cuiabá, MT e Gennari et al. (2002) em São Paulo, que encontraram uma maior ocorrência de cães positivos com acesso as ruas. Provavelmente esteja associada a animais que tem acesso a rua livremente o que não foi observado neste trabalho, aonde os animais iam a rua, porém sob os cuidados de seus proprietários.

Tabela 10. Importância do contato com a rua na infecção natural por *Neospora caninum* em cães.

Características	Animais	Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^a	
Características	Sorologia ^b	Valores	Fator de Risco		
Sim	Positiva:	26(7) ^c	0,6794	1,0189	0,9555 – 1,0865
	Negativa:	272(68)			
Não	Positiva:	7 (2)			
	Negativa:	93 (23)			
Total		398(100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^c Valores relativos em percentagem

4.2.8 Sinais clínicos neurológicos

Apenas dois animais apresentaram sinais neurológicos (Tabela 11) e não houve significância quanto a esta variável, igualmente observados no trabalho Souza et al.(2002), Moraes et al. (2008), Fernandes et al.(2004), Azevêdo et al. (2005), Cunha-Filho et al. (2008), Fridlund-Plugge et al. (2008), Sicupira et al.(2012), diferente do encontrado por Mineo et al. (2001), onde os animais relacionado ao estudo apresentavam sintomatologia nervosa. A não observância desse critério no presente trabalho pode estar relacionada a outros fatores concomitantes, pois apenas dois únicos animais estudados no presente trabalho com quadro clínico neurológico foram sororreagentes a *N. caninum*.

Tabela 11. Importância dos sinais clínicos neurológicos na infecção natural por *Neospora caninum* em cães.

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^a
	Sorologia ^b	Valores			
Sim	Positiva:	2 (0) ^c	0,5626	0,5085	0,1261 – 2,050
	Negativa:	42(10)			
Não	Positiva:	32 (8)			
	Negativa:	326 (81)			
Total		402 (100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^c Valores relativos em percentagem

4.2.9 Vacinação

A vacinação nos animais deste estudo, não se mostrou um fator significativo em relação à positividade dos cães (Tabela12). Porém, Patitucci et al. (2001) sugeriram que possa ocorrer imunossupressão nos animais quando vacinados e com isso a observância de sororreação a *N. caninum* o que não foi relacionado por Ghalmi et al. (2009) a este fator e sim de haver a possibilidade de estimulação da vacina para outros agentes etiológicos favorável ao animais responderem imunologicamente a infecção natural por *N. caninum* na Argélia no norte da África.

Tabela 12. Importância da vacinação na infecção natural por *Neospora caninum* em cães.

Características	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^a
	Sorologia ^b	Valores			
Sim	Positiva:	30 (8) ^c	1,00	1,099	0,3513 – 3,435
	Negativa:	325 (82)			
Não	Positiva:	3 (1)			
	Negativa:	36 (9)			
Total		402 (100)			

^a Usando aproximação de Katz; ^b RIFI; ^c Valores relativos em percentagem

4.2.10 Regressão logística

A idade foi o fator associativo mais importante (Tabela 13), haja vista que quanto mais idade o animal venha a ter, mais chance de adquirir a infecção. De acordo com Nazir et al. (2014) isto pode estar relacionado a uma infecção pós-natal. Quanto ao sexo, apesar de não se observar significância, ainda Nazir et al. (2014) mencionaram que machos eram bem mais sororreagentes a *N. caninum* do que as fêmeas em áreas de criação leiteira.

Tabela 13. Regressão logística entre as variáveis associadas a cães sororreagentes para *Neospora caninum*

Termos	OR	95%	I.C.	Coefficiente	S.E.	Z-Statistic	Valor de <i>p</i>
Alimentação (Sim/Não)	0,6166	0,2864	1,3274	-0,4836	0,3912	-1,2361	0,2164
Faixaetária (Sim/Não)	<u>2,2031</u>	<u>1,0507</u>	<u>4,6193</u>	0,7898	0,3778	2,0909	<u>0,0365</u>
Sexo (Sim/Não)	1,9725	0,9110	4,2708	0,6793	0,3941	1,7234	0,0848
CONSTANTE	*	*	*	-2,9432	0,3991	-7,3742	<u>0,0000</u>

Likelihood Ratio: 9,2193; Valor de *p* = 0,0265

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi utilizada uma soroteca pertencente a um CTI Veterinário, aonde os animais chegavam para serem atendidos em situações de emergência, como atropelamentos, piometras, choque anafilático, etc. com isso, algumas fichas ficaram com informações incompletas.

A grande maioria de cães de apartamento, são de pequeno porte, devido a facilidade de mantê-los nesse ambiente.

Os proprietários dos animais do estudo prezam pela qualidade de vida dos mesmos, proporcionando assim uma total assistência médica e afetiva.

Apesar de serem cães domiciliados e de uma região urbana, a presença do agente etiológico *N. caninum* estava presente com uma porcentagem significativa em relação a outras regiões do Brasil.

Mediante os resultados encontrados observam-se estreita relação entre a infecção natural e faixa etária, porém não se deve subestimar o sexo e alimentação na dispersão de *N. caninum* entre os cães atendidos no CTI Veterinário na Barra da Tijuca, cidade do Rio de Janeiro, RJ.

6 CONCLUSÕES

6.1 A Presença de animais sororreagentes a RIFI para *N. caninum* foi de 8,46% (34/402) atendidos no CTI Veterinário na Barra da Tijuca, Cidade do Rio de Janeiro, RJ, o que indica ser o primeiro relato da presença de infecção de *N. caninum* em cães do estado do Rio de Janeiro, RJ;

6.2 A idade foi fator de risco de infecção, haja vista tratar-se de animais com idade que variaram de três meses até 19 anos, porém com a grande maioria acima de 10 anos, o que pode estar relacionado a infecção pós natal, sendo que os animais que moravam em apartamento tiveram duas vezes mais fator de proteção frente ao agente etiológico estudado; Porém, os animais de porte pequeno foram os mais sororreagentes a infecção por *N. caninum*;

6.3 A pesar de dois dos animais apresentarem sinais neurológicos não se pode correlacioná-los com a infecção por *N. caninum*, por serem sororreagentes positivos; o que indica que animais com neuropatias necessariamente não estejam vinculados a neosporose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; RODRIGUES, A.A.R.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Veterinary Parasitology*, v. 142, n. 1-2, p. 71-77, 2006.

ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 198, n. 2, p. 241-244, 1991.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J. M.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M. de F. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 135, n. 3-4, p. 375-379, 2006.

ATKINSON, R.A.; COOK, R.W.; REDDAKLIFF, L.A.; ROTHWELL, J.; BROADY, K.W.; HARPER, P.; ELLIS, J.T. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Australian Veterinary Journal*, v. 78, n. 4, p. 262-266. 2000.

AZEVÊDO, S.S.; BATISTA, C.S.; VASCONCELLOS, S.A.; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.; RODRIGUES, A.A.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, northeast region of Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 79, n. 1, p. 51-56. 2005.

BARBER, J.S.; HOLMDAHL, O.J.M.; OWEN, M.R.; GUY, F.; UGGLA, A, TREES, A.J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology*, v. 111, n. 5, p. 563-568, 1995.

- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record*, v. 139, n. 18, p. 439-443, 1996.
- BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Veterinary Pathology*, v. 27, n. 5, p. 354-361, 1990.
- BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; BACIGALUPE, D.; KIENAST, M.; UNZAGA, J.M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Veterinary Parasitology*, 131: 299- 303, 2001.
- BENETTI, A.H.; TONIOLLO, G.H.; SANTOS, T.R.; GENNARI, S.M.; COSTA, A.J.; DIAS, R.A. Ocorrência de anticorpos anti- *Nespora caninum* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Ciência Animal Brasileira*. v. 9, n.1, p. 177-180, 2008.
- BJERKAS, L.; 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.
- BJÖRKMAN, C.; LUNDÉN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBER, J.; TREES, A.J.; UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, v. 16, n. 12, p. 643-648, 1994.
- BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; STENLUND, S.; MALEY, S.W.; BUXTON, D.; UGGLA, A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, n.1, p. 41-44.1999.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.
- BOAVENTURA, C.M.; DE OLIVEIRA, V.S.F.; MELO, D.P.G.; BORGES, L.M.F.; DA SILVA, A.C. Prevalência de *Neospora caninum* em cães de Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 1, p 15-22, 2008.
- BOYD, S.P.; BARR. P.A.; BROOKS, H.W.; ORR, J.P. Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 46, n. 2, p. 85–88, 2005.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; NUNES C.M.; SERRANO, A. C. M.; MOURA, A.B.; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; DIAS R.A.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. *Arquivos de Veterinária*, v. 23, n. 1. p. 40-46, 2007.

BRINKER, J.C. *Prevalência de anticorpos para Neospora caninum em cães das áreas urbanas e rural do município de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul*. 2012. 74 f. Dissertação (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CAETANO, T.M.; ARAÚJO, F.A.P. DE; SILVA, R.G. DA; STOBBER, N.S. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* em cães de área urbana no município de Porto Alegre-RS. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.19, n. 3, p. 154-157, 2012.

CAÑON-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiological Reviews*, v.57, n. 4, p. 953-994, 1993.

COELHO, C.D. *Deteção de anticorpos séricos anti-Toxoplasma gondii Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em cães domiciliares, com infecção natural e experimental, pelos métodos de hemaglutinação e imunofluorescência indiretas*. 1996. 48p. Dissertação (Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J.P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 5, n. 4, p. 572-578, 1993.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.; GONDIM, L.F.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2006.

CORLISS, J.O. Na interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta of Protozoology*, v. 33, n.1, p. 1-51, 1994.

COX, F.E.G. A new classification of the parasitic protozoa. *Protozoological Abstract*, v. 5, n. 1, p. 9-14, 1981.

CUDDON, P.; LIN, D.S.; BOWMAN, D.D.; LINDSAY, D.S.; MILLER, T.K.; DUNCAN, I.D.; DELAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.; SUTER, M.; COOPER, B. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 6, n. 6, p. 325-332, 1992.

CUNHA FILHO, N.A.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; RAGOZO, A.M.A.; GENNARI, S.M.; LUCIA JUNIOR, T.; FARIAS, N.A.R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, supl. 1, p.301-306, 2008.

DE SOUSA, M.E.; NASCIMENTO, W.J.; FEITOSA, P.P.; DE SOUZA, O.L.; PINHEIRO, J.W.; MOTA, R.A. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in the state of Alagoas, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, p. 287-290, 2012.

DEAN, A.G.; ARNER, T. Epi Info: Epidemiology of program office. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/epiinfo/index.html> >. Acesso em: 27 Mai. 2013.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; HESSELINK, J.W.; WOUDA, W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Veterinary Parasitology*, v. 105, n. 2, p. 89-98, 2002.

DUBEY JP, CARPENTER JL, SPEER CA, TOPPER MJ, UGGLA A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988b.

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

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.; JENKINS, M.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.; MARTINS, J.; KWOK, O.; 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. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

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

- DUBEY, J.P., BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 8, p.929–946, 2002.
- DUBEY, J.P.; KNICKMAN, E.; GREENE, C.E. Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. *Acta Parasitologica*, v. 50, n. 2, p.176–179, 2005.
- DUBEY, J.P.; KOESTNER, A.; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.197, n.7, p.857-860, 1990.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis. *Parasitology Today*, v.9, n. 12, p. 452-458, 1993.
- DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and Neosporosis. In: GREENE C. E. (ed.) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd Philadelphia: WB Saunders. 2006. p. 754-775.
- DUBEY, J.P.; METZGER, F.L.J.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; FRITZ, D.L. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. *Veterinary Dermatology*, v. 6, n. 1, p. 37-43, 1995.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: The Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.
- FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural áreas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, *Brazilian Veterinary Parasitology*, n.123, v.1– 2, p.33–40, 2004.
- FRIDLUND-PLUGGE, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; RICHARTZ, R. R.T.B.; DAL PIZZOL, J.; MACHADO JR, P.C.; PATRÍCIO, L.F.L.; ROSINELLI, A.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná state, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 4, p.222-226, 2008.
- GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; D'AURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the City of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 106, n. 2, p. 177- 179, 2002.

GHALMI, F.; CHINA, B.; KAIDI, R.; LOSSON, B. First epidemiological study on exposure to *Neospora caninum* in different canine populations in the Algiers District (Algeria). *Parasitology International*, v. 58, n. 4, p. 444 - 450, 2009.

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

GONDIM, L.F.; McALLISTER, M.M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 134, n. 1-2, p.33-39, 2005.

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

GRAHAM, D.A. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Veterinary Record*, v. 144, n. 24, p. 672-673, 1999.

GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROSADO, I.R.; MORAIS, L.G.; SANTOS, R.R.D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, supl. 1, p. 49-53, 2009.

HAY, W.H.; SHELL, L.G., LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *Journal American Veterinary Medicine Association*, v.197, n. 1, p.87-89, 1990.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEI, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research*, v. 82, n. 6, p. 497-504, 1996.

HORNOK, S.; EDELHOFER, R.; FOK, É.; BERTA, K.; FEJES, P.; RÉPÁSI, A.; FARKAS, R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 3-4, p. 197–201, 2006.

HURKOVA, L.; MODRY, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 1-2, p.150–154, 2006.

JACKSON, W; LAHUNTA, A DE; ALASKA, J; COOPER, B; DUBEY, J. 1995. *Neospora caninum* adult dog with progressive cerebellar signs. Disponível em: < <http://www.fao.org/agris/search/display.do?f=/.1997/v2304/US9627239.xml;US9627239> >. Acesso em: 4 Mai 2008.

JARDINE, J.E.; DUBEY, J.P. Canine neosporosis in South Africa. *Veterinary Parasitology*, v. 44, n. 3-4, p. 291- 294, 1992

JESUS, E.E.V.; SANTOS, P.O.M.; BARBOSA, M.V.F.; PINHEIRO, A.M.; GONDIM, L.F.P.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia – Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 1, p. 5-10, 2006.

LASRI, S.; MEERSCHMAN, F. DE; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Veterinary Parasitology*, v. 123, n. 1-2, p. 25–32, 2004.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1521-3, 1999b.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; COLE, R.A.; NUEHRING, L.P.; BLAGBURN, B.L. *Neospora*-induced protozoal abortion in cattle. *Compendium of Veterinary in Continuing Education*, v.15, n. 6, p. 882-889, 1993.

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.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.H.F.; SEGUNDO, G. R.S.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clinical Vaccine and Immunology*, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LOPES, M.G.; MENDONÇA, I.L.; FORTES, K.P.; AMAKU, M.; PENA, H. DE F.J.; GENNARI, S.M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011.

MAGALHÃES, V.C.S.; SICUPIRA, P.M.L.; GONDIM, L.F.P.; MUNHOZ, A.D. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães do Município de Ilhéus, Bahia. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 1, p. 306-311, 2009.

McALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today*, v. 15, n. 6, p. 216-217, 1999.

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

MARTIN, P.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitology Research*, v. 86, n. 1, p. 1-7, 2000.

McINNES, L.M.; IRWIN, P.; PALMER, D.G.; RYAN, U.M. *In vitro* isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 3-4, p. 355-363, 2006.

MEERBURG B.G.; DE CRAEYEC, S.; DIERICK, K.; KIJLSTRA, A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, v. 184, n. 2-4, p. 317-363, 2006.

MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.O. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitology Research*, v. 86, n. 2, p. 169-178, 2000.

MINEO T.W.; SILVA, D.A.O., COSTA, G. N.H.; VON ANCKEN, A.C.; KASPER L.H., SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 30, n. 8, p. 900-906, 2000.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a Veterinary hospital from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.

MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; FAVA, C.D.; STEFANO, E.; CROCCI, A.J. Ocorrência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães da microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo, BR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2008.

NAZIR, M.M.; MAQBOOL, A.; AKHTARB, M.; AYAZ, M.; AHMAD, A.N.; ASHRAF, K.; ALI, A.; ALAM, M.A.; ALI, M.A.; KHALID, A.R.; LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* prevalence in dogs raised under different living conditions. *Veterinary Parasitology*, 2014. [http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.041]

NOGUEIRA, C.I. *Estudo prospectivo de Neospora caninum em cães do sul de Minas Gerais*. 2012. 113 p. Dissertação. (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 7, n. 2, p. 273-275, 1995.

PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.213, n.11, p.1595, 1998.

PASQUALI, P.; MANDARA, M.T.; ADAMO, F.; RICCI, G.; POLIDORI, G.A.; DUBEY, J.P. Neosporosis in a dog in Italy. *Veterinary Parasitology*, v. 77, n. 4, p. 297-299, 1998.

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A.; ISRAEL, K.F. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 33, n. 2, p. 227-232, 2001.

PERL, S.; HARRUS, S.; SATUCHNE, C.; YAKOBSON, B.; HAINES, D. Cutaneous neosporosis in a dog in Israel. *Veterinary Parasitology*, v.79, n.3, p.257-261, 1998.

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

PETERSEM, E. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerging infectious disease*, 1999. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no2/petersem.htm> >. Acesso em: Mai 2012.

POLI, A.; MANCIANTI, F.; CARLI, M.A.; STROSCIO, M.C.; KRAMER, L. *Neospora caninum* infection in a Bernese cattle dog from Italy. *Veterinary Parasitology*, v. 78, n. 2, p. 79-85, 1998.

RASMUSSEN, K.; JENSEN, A.L. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Veterinary Parasitology*, v. 62, n. 3-4, p. 345-349, 1996.

REICHEL, M.P. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 46, n. 1, p.38, 1998.

- REITEROVÁ K., ŠPILOVSKÁ S., ANTOLOVÁ D.; DUBINSKÝ, P. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: The current serological follow-up in Slovakia. *Veterinary Parasitology*, v. 159, n. 1, p. 1-6, 2009.
- RUEHLMANN, D.; PODELL, M.; OGLESBEE, M.; DUBEY, J.P.: Canine neosporosis: a case report and literature review. *Journal American Animal Hospital Association*, v. 31, n. 2, p.174–183, 1995.
- SAMPAIO, I. B.M. *Estatística Aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMV Z, 1998. 221p.
- SÁNCHEZ G.F., MORALES S.E., MARTINEZ M.J. & TRIGO J.F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.
- SAWADA, M.; PARK, C.H.; KONDO, H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 60, n. 7, p. 853–854, 1998.
- SAWADA, M.; PARK, C.H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T.; HARITANI. Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 60, n. 7, p. 853–854, 1998.
- SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 14, p. 1525–1537, 2005.
- SHIVAPRASAD, H.L.; ELY, R.; DUBEY, J.P. *Neospora*- like protozoan found in an aborted bovine placenta. *Veterinary Parasitology*, v. 34, n. 1-2, p. 145-148, 1989.
- SICUPIRA, P.M.L.; de MAGALHÃES, V.C.S.; GALVÃO, G. da S.; PEREIRA, M.J.S.; GONDIM, L.F.P.; MUNHOZ, A.D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 185, n. 2-4, p. 305-308, 2012.
- SOBRINO, R.; DUBEY, J. P.; PABÓN, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O. C.; MILLÁN, J.; ARNAL, M. C.; LUCO, D. F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; THULLIEZ, P.; GORTÁZAR, C.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, v.155, n. 3-4, p.190-194, 2008.
- SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES, J. S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy farms in Paraná *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.
- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *Journal of Protozoology*, v. 36, n. 5, p. 458-63, 1989.

- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M.; BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.
- TEIXEIRA, M.C.; DE ARAUJO, F. A.P.; DA SILVA, R.G.; STOBBE, N.S. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* em cães de área urbana no município de Porto Alegre-RS. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 19, n. 3, p. 154-157, 2012.
- TEIXEIRA, W.C.; SILVA, M.I.S.; PEREIRA, J.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; GONDIM, L.F.P. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 685-687, 2006.
- THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal Veterinarian Diagnostic Investigation*, v. 1, n. 3, p. 205-209, 1989.
- THORTON, R.N.; THOMPSON, E.J.; DUBEY, J.P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 39, n. 4, p. 129-133, 1991.
- UENO, T.E.H. *Prevalência de infecções por Toxoplasma gondii e Neospora caninum em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil*. 2005. 107p. Dissertação (Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; JAKUBEK, E.-B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.
- VARANDAS, N.P.; RACHED, P.A.; COSTA, G.H.N.; SOUZA, L.M.; CASTAGNOLLI, K.C.; COSTA, A.J. Frequência de anticorpos anti-*Neosporacanium* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. *Seminário: Ciências Agrárias*, v. 22, n. 1, p. 105-111, 2001.
- WOUDA W., DIJKSTRA TH., KRAMER A.M.H., VAN MAANEN C. & BRINKHOF J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n.10, p. 1677- 1682, 1999.

8 ANEXOS

Anexo 1. Declaração do CTIVeterinário

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que autorizo a utilização da soroteca de 402 cães, bem como ter acesso aos seus prontuários atendidos no CTI Veterinário sob minha responsabilidade para ser usada no diagnóstico de *Neospora caninum*, cujos resultados como parte dos dados da Tese de Doutorado da Médica Veterinária LIANNA MARIA DE CARVALHO BALTHAZAR, discente do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Rio de Janeiro, 27 de maio de 2014.

Dr. Paulo Daniel Sant'Anna Leal Dr. CsVs

Médico Veterinário CRMV/RJ 3260

ATENDIMENTO 24H

3326-0440 | 7840-7133

www.ctiveterinario.com.br | ctivet@ctiveterinario.com.br
Av. das Américas, 3939 - Bl.2 - Lj. 1 - Shopping Esplanada da Barra.
Barra da Tijuca-RJ | CEP: 22631003 - CNPJ: 03274141/0001-90

Clinica Geral 24h | Anestesia e Controle da dor | Cardiologia Clínica, EcoDoppler e Eletrocardiograma | Cirurgia geral e Criocirurgia
Citologia, Histopatologia e Necropsia | Classificação sanguínea (tipo sanguíneo) | Colocação de Microchip | Dermatologia
Diagnóstico e Laboratório Clínico 24h | Endocrinologia | Endoscopia | Fisioterapia e Acupuntura | Ultrassonografia e Radiologia
Odontologia | Hematologia e Transusão | Nefrologia | Neurologia Clínica e Cirúrgica | Oftalmologia Clínica e Cirúrgica
Oncologia Clínica e Cirúrgica | Ortopedia Clínica e Cirúrgica | Profilaxia com vacinas importadas.

Anexo 2. Declaração da CEUA/IV/UFRRJ



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
BR 465, Km 7 - Centro - Seropédica - Rio de Janeiro - CEP: 23.890-000
Telefone: (21) 2682-3051 - E-mail: ceua.iv.ufrrj@gmail.com

Seropédica 29 de maio de 2014

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO

Declaramos ter recebido o formulário para solicitação de permissão de uso de animais para fins científicos e ou ensino e que este será submetido a avaliação na próxima reunião de CEUA/IV/UFRRJ. Segue abaixo dados pertinentes ao formulário:

Número do Protocolo: 044/2014

Responsável principal pela condução do protocolo: Carlos Wilson Gomes Lopes

Título do Protocolo: "*Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) em cães sororreagentes da região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ"

Data de recebimento: 28/05/2014

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

Anexo 3. Ficha Clínica

I-Nome do proprietário: _____

II-Endereço completo: _____

Endereço eletrônico email: _____

III- Dados do animal:

Nome: _____, Raça: _____, Porte: _____, Peso: _____, Pelagem: _____, Idade ou data de nascimento _____

Sexo: () M () F / Castrado: () S () N

IV- Manejo Geral:

Habitat: Apartamento (), Casa s/ quintal (), Casa c/ quintal (), Sítio (), Fazenda ()

Local de manutenção desses animais: C/ o dono (), Canil (), Outros: _____

Modo de limpeza do ambiente: _____

Contato com outros animais: Sim () Não ()

Qual/is: _____

Apetite: Normal () Aumentado () Diminuído () Ausente () Não sabe informar ()

Ato de urinar: Normal () Aumentado () Diminuído () Ausente () Não sabe informar ()

Dieta alimentar Ração () Qual: _____

Comida caseira () Qual: _____

Comida caseira + ração () Qual: _____

V - Possui Méd Vet permanente: Sim () Não ()

Motivo do atendimento no Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária: _____

Anexo 4. Exame físico do animal

I – Número da ficha do proprietário: _____
II- Exame Geral: Atitude/Comportamento: Normal () Apático () Excitado () Deprimido ()
Em decúbito ()
Estado Nutricional: Obeso () Bom () Regular () Ruim () Caquético ()
Desidratado: Sim () Não ()
Linfonodos: Normais () Aumentados ()
Quais: _____
Temperatura: _____°C Frequência Cardíaca: _____ bpm. Observação: _____
Frequência Respiratória: _____ mpm. Observação: _____
Intolerância a exercícios: Não () Sim () _____
Mucosas: Normocorada () Pálida () Ictérica () Congesta ()
Secreção Ocular: Não () Sim () Observação: _____
Auricular: Não () Sim () Observação: _____

Secreção Nasal: Não () Sim () Observação: _____
Secreção Genito urinária: Não () Sim () Observação: _____
Pele/Pelos: Bom () Regular () Ruim () Observação: _____
Lesões na pele: Não () Sim () Quais: _____
Carrapatos: Não () Sim () Identifique: _____
Pulgas: Não () Sim () Sarna: Não () Sim () Quais: _____

VI-Observações

Anexo 5. Aspectos epidemiológicos em Cães sororreagentes a *Neospora caninum* procedentes de região urbana da cidade do Rio de Janeiro, RJ

Fatores	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^b
	Positivo ^c	Negativo			
<i>Faixa etária:</i>					
3 meses – ≤10 anos	16 (4)	249 (62) ^d	0,0221	1,082	1,007 a 1,162
>10 – 19 anos	18 (4)	119 (30)			
<i>Pequeno porte:</i>					
Sim	13 (3)	223 (55)	0,0169	0,4354	0,2244 – 0,8448
Não	21 (5)	145 (36)			
<i>Médio porte:</i>					
Sim	9 (2)	69 (17)	0,2640	1,495	0,7273 – 3,075
Não	25 (6)	299 (74)			
<i>Grande porte:</i>					
Sim	12 (3)	76 (19)	0,0798	1,946	1,003 – 3,776
Não	22 (5)	292 (73)			
<i>Contato com a rua:</i>					
Sim	26 ()	272 ()	0,6794	1,0189	0,9555 – 1,0865
Não	7 ()	93 ()			
<i>Importância do sexo:</i>					
Machos	21 (5)	191 (48)	0,2874	1,448	0,7456 to 2,811
Fêmeas	13 (3)	177 (44)			

^a RR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem

(Continua)

Anexo 5. Aspectos epidemiológicos em Cães sororreagentes a *Neospora caninum* procedentes de região urbana da cidade do Rio de Janeiro, RJ. (Continuação)

Fatores	Animais		Valor de <i>p</i>	<i>RR</i> ^a	IC 95% ^b
	Positivo ^c	Negativo			
<i>Moradia:</i>					
Apartamento	19 (5)	264 (66) ^d	0,0005	2,879	1,630 to 5,084
Outros	18 (4)	119 (30)			
<i>Presença de outros animais:</i>					
Sim	1 (1)	15 (4)	1,00	1,0269	0,9010- 1,1704
Não	29 (8)	304 (87)			
<i>Alimentação:</i>					
Industrializado	12 (3)	179 (46)	0,2001	0,6283	0,3158 – 1,250
Não industrializado	20 (5)	180 (46)			
<i>Vermifugação:</i>					
Sim	19 (5)	223 (57)	0,7087	0,7114	0,9237 - 1,0481
Não	14 (4)	136 (35)			
<i>Vacinação:</i>					
Sim	30 (8)	325 (82)	1,00	1,099	0,3513 – 3,435
Não	3 (1)	36 (9)			
<i>Sinais neorológicos:</i>					
Sim	2 (1)	42(10)	0,5626	0,5085	0,1261 – 2,050
Não	32 (8)	326 (81)			

^aRR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem

Anexo 6. Fatores de Risco para a infecção de *Neospora caninum* em cães da cidade do Rio de Janeiro, RJ: modelo final para a regressão logística com resultados de fatores de risco (RR) e com 95% de intervalo de confiança (IC) com probabilidade de até 30%.

Variáveis	RR	95% IC	Valor de <i>p</i>
Faixa etária	1,082	1,007 - 1,162	0,0221
Pequeno porte	0,435	0,2244 – 0,8448	0,0169
Médio porte	1,495	0,7273 – 3,075	0,2640
Grande porte	1,946	1,003 – 3,776	0,0798
Importância do sexo	1,448	0,7456 - 2,811	0,2874
Moradia	2,879	1,630 -5,084	0,0005
Alimentação	0,628	0,3158 – 1,250	0,2001

Anexo 7. LOPES, B. DO B.; BERTO, B.P.; **BALTHAZAR, L.M. DE C.**; COELHO, C.D.; NEVES, D.M.; LOPES, C.W.G. psittaciform birds (Aves: Psittaciformes): *Eimeria ararae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the blue-and-yellow macaw *Ara ararauna* (Linnaeus). *Systematic Parasitology*, v. 88, n. 2 p. 175–180, 2014.

Coccidia of New World psittaciform birds (Aves: Psittaciformes): *Eimeria ararae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the blue-and-yellow macaw *Ara ararauna* (Linnaeus)

Bruno do Bomfim Lopes · Bruno Pereira Berto ·
Lianna Maria de Carvalho Balthazar · Cleide Domingues Coelho ·
Daniel Medeiros Neves · Carlos Wilson Gomes Lopes

Received: 26 February 2014 / Accepted: 11 April 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract In the New World, the avian order Psittaciformes comprises 142 species, yet to date only 3 (2%) of the species have been examined for coccidia, and from these only four species of *Eimeria* Schneider, 1875 have been described. In this study, a new coccidian species (Protozoa: Apicomplexa: Eimeriidae) obtained from the blue-and-yellow macaw *Ara ararauna* (Linnaeus) is reported from Brazil. Oöcysts of *Eimeria ararae* n. sp. are ovoidal, measure $28.7 \times 20.2 \mu\text{m}$ and have a smooth, bi-layered wall c. $1.1 \mu\text{m}$ thick. Both micropyle and oöcyst residuum are absent, but polar granules are present. Sporocysts are ovoidal and measure $17.0 \times 8.3 \mu\text{m}$, with knob-like, prominent Stieda body and sporocyst residuum is

composed of granules; sub-Stieda body is absent. Sporozoites are vermiform with one refractile body and a nucleus. This is the fifth description of an eimerid coccidian infecting a New World psittaciform bird.

Introduction

The order Psittaciformes includes 375 species worldwide. Most psittaciform birds are distributed throughout the tropical zones, but some species are found in cold areas of Patagonia, Argentina and Chile. The largest number of species occur in the New World and Oceania with 142 and 123 species, respectively. In

B. do Bomfim Lopes
Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil

B. P. Berto (✉)
Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil
e-mail: bertobp@ufrj.br

L. M. de Carvalho Balthazar
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil

C. D. Coelho
CTI Veterinário, Avenida das Américas, Barra da Tijuca, RJ 3939, Brazil

D. M. Neves
Horto Florestal Mário Xavier, Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente (MMA), BR-465 Km 4, Seropédica, RJ 23835-400, Brazil

C. W. G. Lopes
Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brazil

South America, the richest zone is the Amazon forest (IUCN, 2014).

In common with other vertebrates, psittaciform birds can be infected by eimerid coccidia. Chakravarty & Kar (1946) described *Isoospora psittaculæ* Chakravarty & Kar, 1946 from Alexandrine parakeets *Psittacula eupatria* (Linnaeus). After this description, more species have been described or reported in the Old World and Oceania: *Eimeria dunsingi* Farr, 1960, *Eimeria psittacina* Gottschalk, 1972 and *Isoospora melopsittaci* Bhatia, Chauhan, Arora & Agrawal, 1973 were described from budgerigars *Melopsittacus undulatus* (Shaw); and *Eimeria haematodi* Varghese, 1977 from rainbow lorikeets *Trichoglossus haematodus* (Linnaeus) (Farr, 1960; Gottschalk, 1972; Bhatia et al., 1973; Varghese, 1977). After these original descriptions, only *E. dunsingi* was reported from yellow-billed lorikeets *Neopsittacus musschenbroekii* (Schlegel) and musk lorikeets *Glossopsitta concinna* (Shaw) (Hooimeijer et al., 1993; Gartrell et al., 2000).

In the New World, the first coccidian species described from psittaciform birds was *Eimeria aratinga* Upton & Wright, 1994 from orange-fronted parakeets *Aratinga canicularis* (Linnaeus) from Costa Rica (Upton & Wright, 1994). In 2011, three *Eimeria* spp. were described from South American parrots in Brazil: *Eimeria amazonae* Hofstatter & Kawazoe, 2011 and *Eimeria ochrocephalæ* Hofstatter & Kawazoe, 2011 from the yellow-crowned Amazon *Amazona ochrocephala* (Gmelin); and *Eimeria aestivæ* Hofstatter & Guaraldo, 2011 from the turquoise-fronted Amazon *Amazona aestiva* (Linnaeus) (Hofstatter & Kawazoe, 2011; Hofstatter & Guaraldo, 2011). Recently, Balthazar et al. (2013) reported a case of coccidiosis by *E. amazonae* in a turquoise-fronted Amazon *A. aestiva* kept under quarantine.

The current study describes a new coccidian species infecting blue-and-yellow macaws *Ara ararauna* (Linnaeus) from Brazil. The birds were held in CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres - Centre for Screening of Wild Animals) coordinated by IBAMA/MMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources/Ministério do Meio Ambiente - Brazilian Ministry of the Environment), for rehabilitation and reintroduction into the wild.

Materials and methods

Faecal samples were collected from fifteen blue-and-yellow macaws recovered from the trafficking of wild animals and kept in quarantine in CETAS/IBAMA/MMA facilities, located at the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil. The risk of contamination from the birds previously held was minimised because the samples were collected from newly-arrived birds in CETAS. Faeces were collected and placed in plastic vials containing 2.5% potassium dichromate solution ($K_2Cr_2O_7$) 1:6 (v/v). Samples were transported to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses located at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were placed in a thin layer (c.5 mm) of $K_2Cr_2O_7$ 2.5% solution in Petri dishes, incubated at 23–28°C and monitored daily, until 70% of the oöcysts were sporulated. Oöcysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (S.G. 1.20) and microscopically examined using the technique described by Duszynski & Wilber (1997). Morphological observations, line drawings, photomicrographs and measurements were made using an Olympus BX binocular microscope coupled to a digital camera Eurocam 5.0. All measurements are in micrometres and are given as the range followed by the mean in parentheses.

Results

The fifteen blue-and-yellow macaws examined were apparently healthy but shed oöcysts in the faeces. Initially, the oöcysts were non-sporulated, but approximately 70% of the oöcysts were sporulated at day four (under the conditions used in this study).

Eimeria ararae n. sp.

Type-host: *Ara ararauna* (Linnaeus) (Aves: Psittaciformes: Psittacidae).

Type-specimens: Phototypes and line drawings of sporulated oöcysts are deposited and available (<http://rl.ufrrj.br/lcc>) in the Parasitology Collection of the Laboratório de Coccídios e Coccidioses, at UFRRJ, located in Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. Photographs of the type-host specimens (symbiotypes) are

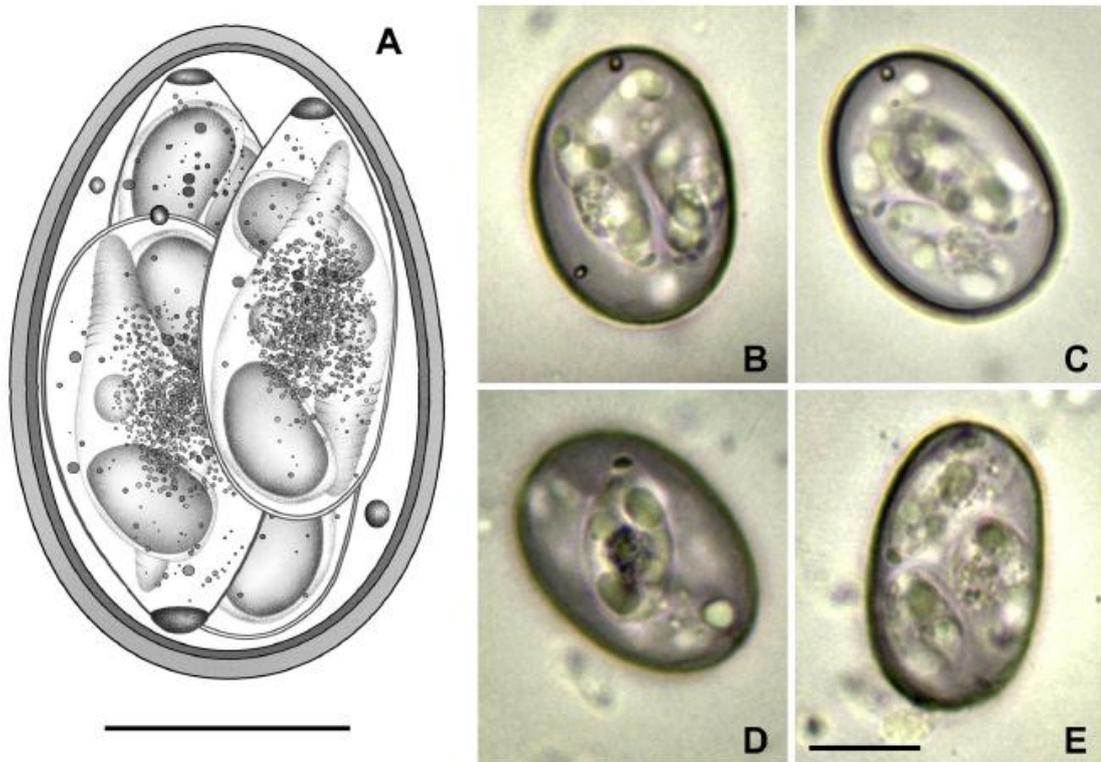


Fig. 1 Oocysts of *Eimeria ararae* from the blue-and-yellow macaw *Ara ararauna*. A, Composite line drawing; B–E, Photomicrographs. Scale-bar: 10 μ m

deposited in the same collection. The repository number is P-51/2014.

Type-locality: Seropédica (22°43′23.79″S, 43°42′36.94″W), Rio de Janeiro, Brazil.

Sporulation time: Four days.

Site: Not investigated.

Etymology: The specific epithet is derived from the common local name for the host, which is ‘arara’.

Description (Fig. 1A–E)

Sporulated oocyst

Oocyst ($n = 20$) ovoidal, 26–32 \times 17–22 (28.7 \times 20.2); length/width (L/W) ratio 1.2–1.6 (1.4). Wall bilayered, 1.0–1.3 (1.1) thick, outer layer smooth, c.2/3 of total thickness. Micropyle and oocyst residuum both absent, polar granule present, frequently as 2 to 4 sub-spheroidal granules.

Sporocyst and sporozoites

Sporocysts ($n = 20$) 4, elongate-ovoidal, 16–20 \times 7–9 (17.0 \times 8.3); L/W ratio 1.8–2.3 (2.0). Stieda body present, knob-like, prominent, 1.0 high \times 2.0 wide; sub-Stieda and para-Stieda body both absent; sporocyst residuum present, consisting of granules clumped together or diffuse. Sporozoites 2, vermiform, with single posterior refractile body, centrally located nucleus, and striations.

Discussion

Studies on coccidia in birds of the Psittaciformes are relatively few compared with the data available for Passeriformes. Coccidia of passerine birds in the New World are described in more than 60 species; whereas only three psittaciform birds were reported as hosts of



Fig. 2 Geographical ranges of the psittaciform hosts of *Eimeria* spp. in the New World

coccidia. Nevertheless, similar to the passerines, psittaciform birds are widely distributed in the New World and may also be infected by coccidia which may be pathogenic, as reported by Balthazar et al. (2013). According to Berto & Lopes (2013) the coccidia reported from birds of the New World are highly relevant, given that transmission of parasites can occur between sympatric susceptible birds. As illustrated in Fig. 2 the wide ranges of psittaciform hosts may ensure transmission of *Eimeria* Schneider, 1875 in Brazil and several other countries in the South and Central America and Mexico: *Ara ararauna* is sympatric with *A. ochrocephala* in cis- and trans-Andean populations; *Ara ararauna*, *A. ochrocephala*

and *A. aestiva* are sympatric in Brazil and Bolivia, and the trans-Andean dispersion of *A. canicularis* is non-sympatric with other psittaciform hosts.

Additionally, psittaciform birds have always been of great interest to people due to their beauty and, for that reason, they have frequently been illegally captured and traded. However, the role of the traffic of wild passerines (biopiracy) and reintroduction by centres screening wild animals for coccidial transmission is unclear. Berto & Lopes (2013) claimed that bird trade should enhance the transmission of coccidia among closely related species. Besides, the centres screening wild animals become more important since a failure to identify a parasite of a bird seized, followed

Table 1 Comparative morphology of *Eimeria* spp. recorded from New World psittaciform birds

Species	<i>Eimeria ararae</i> n. sp.	<i>Eimeria aratinga</i> Upton & Wright, 1994	<i>Eimeria amazonae</i> Hofstatter & Kawazoe, 2011	<i>Eimeria ochrocephalae</i> Hofstatter & Kawazoe, 2011	<i>Eimeria aestivae</i> Hofstatter & Guaraldo, 2011
Host	<i>Ara ararauna</i> (Linnaeus)	<i>Aratinga canicularis</i> (Linnaeus)	<i>Amazona ochrocephala</i> (Gmelin)	<i>Amazona ochrocephala</i> (Gmelin)	<i>Amazona aestiva</i> (Linnaeus)
Reference	Present study	Upton & Wright (1994)	Hofstatter & Kawazoe (2011)	Hofstatter & Kawazoe (2011)	Hofstatter & Guaraldo (2011)
<i>Oöcyst</i>					
Shape	ovoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ovoidal
Length	26–32 (28.7)	32–38 (35.0)	44–54 (48.9)	38–49 (43.8)	33–42 (36.8)
Width	17–22 (20.2)	24–28 (25.9)	32–40 (36.2)	24–32 (27.7)	22–26 (23.7)
Length/Width ratio	1.2–1.6 (1.4)	1.2–1.5 (1.4)	(1.4)	(1.6)	(1.6)
Polar granule	present, 2 to 4 granules	present, fragmented	present, 1, rounded	present, 1, rounded	present, 1, rounded
<i>Sporocyst</i>					
Shape	elongate-ovoidal	ovoidal	ovoidal	ovoidal	ellipsoidal
Length	16–20 (17.0)	18–21 (19.2)	20–23 (22.2)	17–23 (20.6)	18–22 (19.8)
Width	7–9 (8.3)	9–10 (9.8)	9–14 (11.9)	9–12 (10.1)	8–10 (9.3)
Length/Width ratio	1.8–2.3 (2.0)	1.8–2.2 (2.0)	not available	not available	not available

by its release in the wild in areas different from the original range, would provide introduction of a new parasite to susceptible hosts. In this sense, several studies have reported new hosts resulting from the trafficking and/or potential dispersers of coccidia (Lopes et al., 2013; Berto et al., 2013).

The current study is based on the concept of intra-family specificity, according to which new hosts of different genera, but of the same family, may be affected by the same parasite. This concept of specificity proposed by Duszynski & Wilber (1997) has been supported by several studies of passerine hosts (Berto et al. 2011; Lopes et al. 2013); however, this concept needs to be confirmed for Psittaciformes. Therefore, the new coccidian described above was compared in detail with coccidian parasites of New World psittaciform birds that possess similar features and belong to the same host family (Table 1). Oöcysts of *Eimeria ararae* lack sub-Stieda body and are smaller than oöcysts of *E. aratinga*, *E. amazonae*, *E. ochrocephalae* and *E. aestivae*. Additionally, it is noteworthy that new morphological studies should demonstrate

the differences in some characteristic features, such as Stieda and sub-Stieda bodies, polar granules, sporocyst residuum, etc. which were similarly described and/or not emphasised in the original descriptions of *E. amazonae*, *E. ochrocephalae* and *E. aestivae* from *Amazona* spp., justifying the validity of these species and allowing their identification in other hosts.

Based on the morphological features described above, *E. ararae* is considered as a species new to science and the fifth species of *Eimeria* reported from a New World psittaciform bird.

Acknowledgements This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) to B. P. Berto (E-26/110.987/2013). We are thankful to CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres - Centre for Screening of Wild Animals), which is coordinated by IBAMA/MMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources/Ministério do Meio Ambiente - Brazilian Ministry of the Environment), at the municipality of Seropédica, who enabled us to collect samples from birds held to rehabilitation and reintroduction into the wild.

References

- Balthazar, L. M. de C., Lopes, B. do B., Berto, B. P., dos Santos, C. S., Teixeira Filho, W. L., Neves, D. M., & Lopes, C. W. G. (2013). Coccidiosis in a Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*) under quarantine - Case report. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35, 392–396.
- Berto, B. P., Flausino, W., McIntosh, D., & Lopes, C. W. G. (2011). Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, 80, 159–204.
- Berto, B. P., & Lopes, C. W. G. (2013). Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In L. Ruiz, & L. Iglesias (Eds.), *Birds: Evolution and behavior, breeding strategies, migration and spread of disease*. New York: Nova Science Publishers, pp. 47–66.
- Berto, B. P., Ferreira, I., Flausino, W., Teixeira-Filho, W. L., & Lopes, C. W. G. (2013). *Isospora canaria* Box, 1975 (Apicomplexa: Eimeriidae) from canaries *Serinus canaria* Linnaeus (Passeriformes: Fringillidae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, 85, 49–53.
- Bhatia, B. B., Chauhan, P. P. S., Arora, G. S., & Agrawal, R. D. (1973). Species composition of coccidia of some mammals and birds at the Zoological Gardens, Dehli and Lucknow. *Indian Journal of Animal Science*, 43, 944–947.
- Chakravarty, M., & Kar, A. B. (1946). A study on the coccidia of Indian birds. *Proceedings of the Royal Society, B*, 62, 225–233.
- Duszynski, D. W., & Wilber, P. (1997). A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*, 83, 333–336.
- Farr, M. M. (1960). *Eimeria dunsingi* n.sp. (Protozoa: Eimeriidae) from the intestine of a parakeet, *Melopsittacus undulatus* (Shaw). In: Libro Homenaje al Dr Eduardo Caballero y Caballero. Mexico, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, pp. 31–35.
- Gartrell, B. D., O'Donoghue, P., & Raidal, S. R. (2000). *Eimeria dunsingi* in free living musk lorikeets (*Glossopsitta concinna*). *Australian Veterinary Journal*, 78, 717–718.
- Gottschalk, C. (1972). Beitrag zur Faunistik der Vogelkokzidien Thuringens und Sachsens. *Beiträge Vogelkunde*, 18, 61–69.
- Hofstatter, P. G., & Guaraldo, A. A. (2011). A new eimerian species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the blue-fronted Amazon parrot *Amazona aestiva* L. (Aves: Psittacidae) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 97, 1140–1141.
- Hofstatter, P. G., & Kawazoe, U. (2011). Two new *Eimeria* species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the yellow-crowned Amazon *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 97, 503–505.
- Hooimeijer, J., Peek, H. W., & Vertommen, M. H. (1993). Coccidiosis in lorikeets infectious for budgerigar. *Proceedings of Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*, 1, 59–61.
- IUCN (2014). International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. <http://www.iucnredlist.org>. Last accessed 03 April 2014.
- Lopes, B. B., Balthazar, L. M. C., Coelho, C. D., Berto, B. P., Neves, D. M., & Lopes, C. W. G. (2013). Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae). *Coccidia*, 1, 6–9.
- Upton, S. J., & Wright, T. F. (1994). A new species of *Eimeria* (Apicomplexa) from the orange-fronted conure, *Aratinga canicularis* (Psittaciformes), in Costa Rica. *Acta Protozoologica*, 33, 117–119.
- Varghese, T. (1977). *Eimeria haematodi* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the rainbow lorikeet, *Trichoglossus haematodus*, in Papua New Guinea. *Journal of Parasitology*, 63, 210–211.

Anexo 8. BALTHAZAR, L.M. DE C.; LOPES, B. DO B., BERTO, B.P., DOS SANTOS, C.S.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; NEVES, D.M.; LOPES C.W.G. Coccidiose em um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) mantido em confinamento - Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, n. 4, p. 392-396, 2013.

**COCCIDIOSIS IN A BLUE-FRONTED AMAZON PARROT (*Amazona aestiva*)
UNDER QUARANTINE - CASE REPORT***

Lianna Maria de Carvalho Balthazar¹⁺, Bruno do Bomfim Lopes², Bruno Pereira Berto³, Caroline Spitz dos Santos¹, Walter Leira Teixeira Filho⁴, Daniel Medeiros Neves⁵ e Carlos Wilson GomesLopes⁶

ABSTRACT. Balthazar L.M. de C., Lopes B. do B., Berto B.P., dos Santos C.S., Teixeira Filho W.L. Neves D.M. & Lopes C.W.G. **Coccidiosis in a Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*) under quarantine - Case report.** [Coccidiose em um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) mantido em confinamento - Relato de caso]. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(4):392-396, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, BR 465 Km7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: liannavet@yahoo.com.br

An adult male blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*), was kept under quarantine in CETAS/IBAMA Seropédica, RJ, Brazil. Clinical signs consisted of apathy, anorexia, weight loss, ruffled and dull feathers and greenish mucoid diarrhea. Feces were observed stuck to the feathers around the cloacae. Oocysts of the both sample were placed in a 2.5% solution of $K_2Cr_2O_7$ to allow them to sporulate. Upon microscopic examination, unsporulated oocysts were observed in the feces of the first sample. However, oocysts of the second sample, collected three days after the first sample, sporulated and they were recovered for determining the species. The oocysts varied from ovoidal to ellipsoidal with $27.9 \times 26.9\mu m$ in diameters, with a smooth wall consisting of two layers of $1.4\mu m$ thickness. Micropyle and oocyst residuum were absent, but polar granules were present. Sporocysts were elongated and ellipsoidal measuring $19.6 \times 11.1\mu m$. The Stieda body presented a knob-like appearance and was slightly pointed in the external surface. The substieda body was undefined. The sporocyst residuum was composed of scattered granules and the sporozoites were vermiform with a refractile body and a nucleus. The characteristics of the oocysts were similar to those described previously as *Eimeria amazonae*. In addition to the case report of a clinical coccidiosis, comments on geographic distribution and interspecific infections are presented herein.

KEY WORDS. *Amazona aestiva*, coccidiosis, CETAS, quarantine.

RESUMO. Um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), adulto, macho, estava mantido em regime de quarentena no CETAS/IBAMA em Seropédica, RJ. Como sinais clínicos foram observados apatia, anorexia, perda de peso, penas eriçadas e sem brilho, com diarréia mucoide de coloração esverdeada,

* Received on August 5, 2012.

Accepted for publication on September 18, 2013.

¹Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. *Author for correspondence. E-mail:liannavet@yahoo.com.br carolinespitz@yahoo.com.br

²Biólogo Autônomo. Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail:biolopesbb@hotmail.com

³Biólogo, DSc. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail:bertobp@ufrj.br

⁴Biólogo, PhD. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: leira@ufrj.br

⁵Médico-veterinário, MSc. Centro de Triagem de Animais Silvestres, Instituto Brasileiro do Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente e Recursos Renováveis, Seropédica, RJ 23835-400. E-mails: danielmn35@hotmail.com

⁶Médico-veterinário, PhD. LD. DPA, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail:lopescvwg@ufrj.br - CNPq fellowship.

parte residual aderida as penas ao redor da cloaca. Os oocistos de ambas amostras foram colocadas numa solução a 2,5% de $K_2Cr_2O_7$ para lhes permitir esporular. Após exame microscópico, os oocistos da primeira amostra não esporularam. No entanto, os oocistos da segunda amostra, recolhidas três dias após a primeira amostra esporuladas e foram recuperados para determinar as espécies. Os oocistos esporulados variaram de ovoide a elipsoide medindo $27,9 \times 26,9 \mu m$, com uma parede lisa constituída de duas camadas com $1,4 \mu m$ de espessura. Micrópila e resíduo dos oocistos foram ausentes, mas grânulos polares foram presentes. Sporocistos foram alongados e elipsoidais com $19,6 \times 11,1 \mu m$. Corpo de Stieda em forma de botão levemente pontudo em sua porção exterior. Corpo de substância indefinido. O resíduo do sporocisto foi constituído por grânulos dispersos e os esporozoítos foram lanceolados com um corpo refrátil e um núcleo. As características dos oocistos esporulados foram semelhantes à descrita para *Eimeria amazonae*. Ao lado da descrição da coccidiose clínica foi feitas observações sobre a distribuição geográfica e as infecções intestinais específicas.

PALAVRAS-CHAVE. *Amazona aestiva*, coccidiose, CETAS, quarentena.

INTRODUCTION

In Brazil, nearly 12 million animals are illegally traded every year, with specimens of the orders Passeriformes and Psittaciformes often being seized by the environmental authorities from pet owners who keep such animals without legal permission (Ferreira & Glock, 2004, Araújo et al. 2010, IBAMA 2012). In this context, the Centers for Wildlife Screening (CETAS) has the purpose of receiving, cataloguing and treating wild animals rescued or seized by their inspectors, including wild animals maintained illegally as pets (IBAMA 2012).

Coccidiosis in parrots is relatively infrequent, and most often demonstrates a subclinical evolution, but in immunosuppressed, young or stressed animals clinical disease characterized by inactivity, weight loss, retarded growth and greenish or hemorrhagic watery diarrhea, can be observed. Importantly, intestinal lesions caused by coccidia can serve as a gateway for other infections (Godoy 2007). The current manuscript aims to relate a case of coccidiosis in a blue-fronted Amazon parrot kept in quarantine.

CLINICAL FINDINGS

A blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva* Linnaeus, 1758) was maintained in an individual cage under quarantine at a Screening Center (CETAS)/IBAMA in the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Clinical signs were recorded as consisting of apathy, anorexia, weight loss and, ruffled and dull feathers, and notably the production of greenish mucoid diarrhea. Feces were also observed adhered to feathers around the cloacae (Figure 1a,b). Two fresh fecal samples were collected from the bottom of the cage after defecation on two occasions, with a three day interval between collection point. On both occasions samples were immediately placed into plastic vials and transported to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses at the Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária in the Universidade Federal do Rio de Janeiro, *Campus Seropédica*, RJ. A large number of unsporulated oocysts were observed in both samples following the use of a flotation technique in Sheather's sugar solution (sp.g. 1.20). Thereafter, portions of both samples were placed in a thin layer (c.5 mm) of $K_2Cr_2O_7$ 2.5% (w/v) solution in Petri plates with incubation at 23–28°C for up to 10 days, or until 70% of the oocysts were sporulated. However, only the oocysts present in the second sample sporulated. Subsequent identification of sporulated oocysts was used based upon phenotypic characteristics reported by Tenter et al. (2002) and microscopic examination of the morphological characteristics indicated by Duszynski & Wilber (1997). Morphological observations and measurements, in μm , were made using a Zeiss binocular microscope with an apochromatic oil immersion objective lens and a PZO K-15X ocular micrometer. Photomicrographs were taken using an electronic digital camera. Size ranges are provided in parenthesis followed by the mean, and shape index (length/width).

Initially, the oocysts were not sporulated (Figure 2a), but 70% sporulation was observed over a period of seven days. Oocysts (N=10) were ellipsoidal, 41.4 ($36-47$) \times 26.3 ($24-30$), with shape-index of 1.58. Oocyst walls were bi-layered, smooth and showed a thickness of $1,4 \mu m$. Micropyle and oocyst residuum were absent, but polar granules were present. Sporocysts (N=10) were ellipsoidal, $19.6 \times 11.1 \mu m$ ($18.4-21.6 \times 8.6-10.6$). The Stieda body was lightly pointed while the SSB was undefined. The sporocyst residuum was comprised by scattered granules; the



Figure 1. Blue-fronted Amazon parrot. Clinical Coccidiosis (A); greenish watery diarrhea with fecal debris adhered on the cloacae surrounding feathers (B).

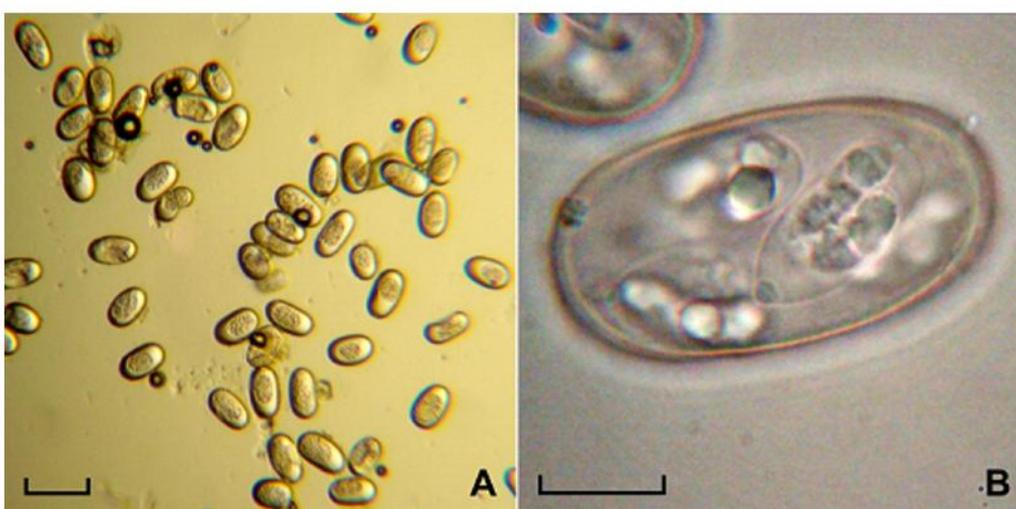


Figure 2. Blue-fronted Amazon parrot. Photographs of *Eimeria amazonae*: unsporulated oocysts. Scale-bar: 50µm (A); sporulated oocyst. Scale-bar: 10 µm (B).

sporozoites were vermiform and possessed a refractile body and a nucleus (Figure 2b).

DISCUSSION

The majorities of the case reports of disease outbreaks, particularly coccidiosis, among animals held under quarantine has associated disease with overcrowding, confinement and stress, and have sometimes reported transmission among the same species or among species of the same family, kept at overcapacity. Such conditions do not represent adequate quarantine, thereby facilitating the spread of patho-

gens. Preventive procedures, implemented upon the arrival of the animal at a screening enter until their subsequent allocation or re-introduction, are fundamental for each animal and are a pre requisite to avoid the dispersion of pathogens, both to their natural environments if they are returned there to, or to other environments to which they may be sent e.g. zoological parks (Godoy 2007, Fritzen 2008).

The clinical signs observed in the animals in this study were considered representative of coccidiosis, and were in part, similar to those described by Godoy (2007), characterized by apathy, ruffled fe-

Table 1. Comparative analysis of sporulated oocysts observed in Psittacid Parrots in Brazil.

Coccidia species	Hosts	Forms	Oocysts				References
			Diameters (μm)		Shaped Index	Wall	
			Length	Width			
<i>Eimeria aestiva</i> (N= 60)	<i>Amazona aestiva</i>	Ovoidal	36,8 (33,2-41,5)	23,7 (21,7-25,7)	1,55	bi-layered	Hofstatter & Guaraldo, 2011
<i>Eimeria amazonae</i> (N= 60)	<i>Amazona ochrocephala</i>	Ellipsoidal	48,9 (44,4-53,8)	36,2 (32,2-39,5)	1,35	bi-layered	Hofstatter & Kawazoe, 2011
<i>Eimeria ochrocephala</i> (N= 60)	<i>Amazona ochrocephala</i>	Ellipsoidal	43,8 (37,9-49,3)	27,7 (24,1-32,0)	1,58	bi-layered	Hofstatter & Kawazoe, 2011
<i>Eimeria amazonae</i> (N= 10)	<i>Amazona aestiva</i>	Ovoidal - Ellipsoidal	41,4 (36,3-46,7)	26,3 (23,6-29,7)	1,58	bi-layered	Present work

athers, greenish watery diarrhea with fecal debris adhered on the cloacae surrounding the feathers, and associated with a large number of oocysts in the fecal samples.

The presence of numerous oocysts was recorded in the freshly collected fecal samples, but they were not sporulated, making it difficult to identify the coccidia species. A comparative analysis of sporulated oocysts observed in Psittacid parrots in Brazil was undertaken (Table 1), as an aid to identification of the oocysts recovered in the current work. It was noted that the morphological descriptions of the sporulated oocysts recovered from the second fecal sample collected in this study were similar to those for *E. aestiva*, as previously described by Hofstatter & Guaraldo (2011) in the feces of a Blue-fronted Amazon parrot (*A. aestiva*), yet at the same they were not morphologically dissimilar from the descriptions of *E. amazonae* and *E. ochrocephalae* reported by Hofstatter & Kawazoe (2011) in the yellow-crowned Amazon parrot (*Amazona ochrocephala* Gmelin, 1788). In light of these difficulties, it is worth considering that the species described by Hofstatter & Kawazoe (2011) and Hofstatter & Guaraldo (2011) may be related as the same species. In fact, this statement was based on an assessment of the geographical distribution of both parrots (Figure 3), which were characterized as sympatric species (IUCN 2013). In addition, they can be captured and maintained in the same quarantine conditions which could favor infection of both species of parrot, with the same infectious agent. As final comments, and in accordance with the recommendations of Duszynski & Wilber (1997), oocysts recovered from a host species should be compared in detail with the sporulated oocyst described previously in the same host family in which the oocysts were found.

Acknowledgements. We are thankful to the CETAS/IBAMA located at Municipality of Seropédica



Figure 3. Geographic range of both parrots in Brazilian territory, according to (IUCN, 2013).

in the State of Rio de Janeiro, Brazil, in particular for staff, that allowed us to take care of this animal, and FAPERJ for supporting this research.

REFERENCES

- Araújo A.C.B., Behr E.R., Longhi S.J., Menezes P.T.S. & Kaniéski M.R. Diagnóstico sobre a avifauna apreendida e entregue espontaneamente na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, 8:279-284, 2010.
- Duszynski D.W. & Wilber P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J. Parasitol.*, 83:333-336, 1997.
- Ferreira C.M. & Glock L. Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, 12:21-30, 2004.
- Fritzen C. *Análise das ações de medicina veterinária no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (Cereias), Araçuaçu - ES*. 2008. 64p. Especialização (Medicina de Animais Selvagens e Exóticos), Universidade Castelo Branco,

- Rio de Janeiro, 2008. (Disponível at: <[http://www.qualittas.com.br/uploads/documentos/Analise %20das%20Acoes%20de%20Medicina%20Veterinaria%20%20Carolina%20Fritzen.PDF](http://www.qualittas.com.br/uploads/documentos/Analise%20das%20Acoes%20de%20Medicina%20Veterinaria%20%20Carolina%20Fritzen.PDF)>.)
- Godoy S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito), p.222-251. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de animais selvagens - Medicina Veterinária*. Manole, São Paulo, 2007.
- Hofstatter P.G. & Guaraldo A.M. A new eimerian species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the blue-fronted Amazon parrot *Amazona aestiva* L. (Aves: Psittacidae) in Brazil. *J. Parasitol.*, 97:1140-1141, 2011.
- Hofstatter P.G. & Kawazoe U. Two new *Eimeria* species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the yellow-crowned Amazon *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) in Brazil. *J. Parasitol.*, 97:503-505, 2011.
- IBAMA. Projeto CETAS - Educação Ambiental. Uma ferramenta contra os maus-tratos e o tráfico de animais silvestres. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/faunasilvestre/wp-content/files/projeto-educacao.pdf>>. Acesso em: 6 jul 2012.
- Tenter A.M., Barta J.R., Beveridge I., Duszynski D.W., Mehlhorn H., Morrison D.A., Thompson R.C. & Conrad P.A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol.*, 32:595-616, 2002.
- IUCN. *Amazona*. Disponível at: <<http://www.iucnredlist.org>>. Accessed on: 10 jul. 2013.

Anexo 9. LOPES, B. DO B.; **BALTHAZAR, L.M. DE C.**; COELHO, C.D.; BERTO, B.P.; NEVES, D.M.; LOPES, C.W.G. Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae). *Coccidia*, v. 1, n. 2, p. 6-9, 2013.

Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae)

Bruno do B. Lopes | Lianna Maria de C. Balthazar | Cleide D. Coelho |
Bruno P. Berto | Daniel M. Neves | Carlos Wilson G. Lopes

Submetido em 01.10.2013
Aceito em 17.10.2013

Abstract Lopes BB, Balthazar LMC, Coelho CD, Berto BP, Neves DM, Lopes CWG. 2013. **Trafficking in wild passerines, reintroduction and coccidial transmission: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae).** [Tráfico de pássaros silvestres, reintrodução e transmissão de coccídios: *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008 (Apicomplexa: Eimeriidae) do temperaviola *Saltator maximus* Müller (Passeriformes: Cardinalidae).] *Coccidia* 1, 6-9. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: bertobp@ufrj.br

The current study reports buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller parasitized by *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008. This coccidium was originally described parasitizing caged green-winged saltators *Saltator similis* D'Orbigny, Lafresnaye, possibly captured at some moment from the wild. Its oocysts are sub-spherical to ellipsoidal, 25.0 × 24.0 µm, with a smooth, bilayered wall. Micropyle and oocyst residuum are absent, but one or two polar granules are present. The sporocysts are ovoidal, 18.4 × 11.4 µm. The Stieda body is bubble-shaped and the substieda body is large and rounded. The sporocyst residuum is composed of scattered or clustered granules. The sporozoites are vermiform, with refractile bodies at both ends. This finding evidenced the role of the traffic of wild passerines (biopiracy) and reintroduction by centers screening of wild ani-

mals on the coccidial transmission, once that *I. trincaferri* oocysts were recovered from buff-throated saltators *S. maximus* kept under quarantine in preparation for reintroduction.

Keywords Morphology, sporulated oocysts, diagnostic, Coccidia, biopiracy, CETAS.

Resumo O presente estudo relata temperaviolas *Saltator maximus* Müller parasitados por *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar,

BB Lopes | CD Coelho

Profissional Autônomo associado ao Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).
E-mail: biolopesbb@hotmail.com
domingues.cleide@yahoo.com.br

LMC Balthazar

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ.
E-mail: liannavet@ufrj.br

BP Berto

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: bertobp@ufrj.br

DM Neves

Horto Florestal Mário Xavier, Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente (MMA), 23835-400, Seropédica, RJ, Brasil.
E-mail: danielmn35@hotmail.com

CWG Lopes ✉

Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ. CNPq fellowship.
E-mail: lopescwg@ufrj.br

Flausino, Lopes, 2008. Este coccídio foi originalmente descrito parasitando trinca-ferros *Saltator similis* d'Orbigny, Lafresnaye engaiolados e possivelmente capturados em algum momento do ambiente silvestre. Seus oocistos são subsféricos a elipsóides, $25,0 \times 24,0 \mu\text{m}$, com parede de camada dupla e lisa. Micrópila e resíduo do oocisto estão ausentes, mas um ou dois grânulos polares estão presentes. Os esporocistos são ovóides, $18,4 \times 11,4 \mu\text{m}$. O corpo de Stieda é em forma de bolha e o corpo de substieda é grande e arredondado. O resíduo de esporocisto é composto de grânulos dispersos ou agrupados. Os esporozoítos são vermiformes, com corpos refractáveis em ambas as extremidades. Este relato evidencia o papel do tráfico de animais silvestres (biopirataria) e reintrodução pelos centros de triagem de animais silvestres na transmissão de coccídios, uma vez que oocistos de *I. trincaferri* foram recuperados de tempera-violas *S. maximus* mantidos sob quarentena, em preparação para a reintrodução.

Palavras-chave Morfologia, oocistos esporulados, diagnóstico, Coccidia, biopirataria, CETAS.

Introduction

The buff-throated saltator *Saltator maximus* Müller is a New World passerine bird of the family Cardinalidae. It has a large geographic range in South and Central Americas. This species has always been of great interest to people due to its beauty and vocal repertoire and, for these reasons, has been illegally captured and traded in Brazil (Sick 1997, CBRO 2011, IUCN 2013).

Recently, some coccidian parasites were reported from green-winged saltators *Saltator similis* D'Orbigny, Lafresnaye: (1) *Isospora vanriperorum* Levine, 1982; (2) *Isospora saltatori* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008; (3) *Isospora trincaferri* Berto, Balthazar, Flausino, Lopes, 2008; and (4) *Isospora similisi* Coelho, Berto, Neves, Oliveira, Flausino, Lopes, 2013 (Lopes et al. 2007, Berto et al. 2008, Coelho et al. 2013).

The current study reports buff-throated saltator *S. maximus* parasitized by *I. trincaferri*. These saltators were held in CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres – Center

for Triage of Wild Animals), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Brazilian Institute of Environment and Natural Resources), MMA (Ministério do Meio Ambiente – Ministry of Environment) for rehabilitation and reintroduction into the wild.

Materials and methods

Fecal samples were collected from three buff-throated saltators held in individual cages at the CETAS, IBAMA, MMA facility, located at the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil. The risk of contamination from the previous birds was minimum because the samples were collected from newly arrived birds in CETAS. Feces were collected immediately after defecation and placed in plastic vials containing 2.5% potassium dichromate solution ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1:6 (v/v)). Samples were transported to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses located at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Samples were placed in a thin layer (~5 mm) of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 2.5% solution in Petri dishes, and incubated at 23–28°C for 10 days or until 70% of oocysts were sporulated. Oocysts were recovered by flotation in Sheather's sugar solution (S.G. 1.20) and microscopically examined using the technique described by Duszynski & Wilber (1997). Morphological observations, photomicrographs and measurements, given in micrometers, were made using a Olympus BX binocular microscope coupled to a digital camera Eurocam 5.0. Size ranges are in parentheses following the means.

Results and discussion

Three buff-throated saltators were examined; being that one was positive for coccidia. Initially, the oocysts were nonsporulated, while 70% sporulated by day five.

The identified oocysts (Fig. 1a-b) were sub-spherical to ellipsoidal, $25.0 (24-27) \times 24.0 (23-26) \mu\text{m}$, with shape-index of 1.04 (1.0-1.1). Oocyst wall bi-layered and smooth, $1.2 \mu\text{m}$. Micropyle and oocyst residuum are absent, but one or two polar granules are present. Sporocysts ovoidal, $18.4 (17-20) \times 11.4 (10-12) \mu\text{m}$, with shape-index of with

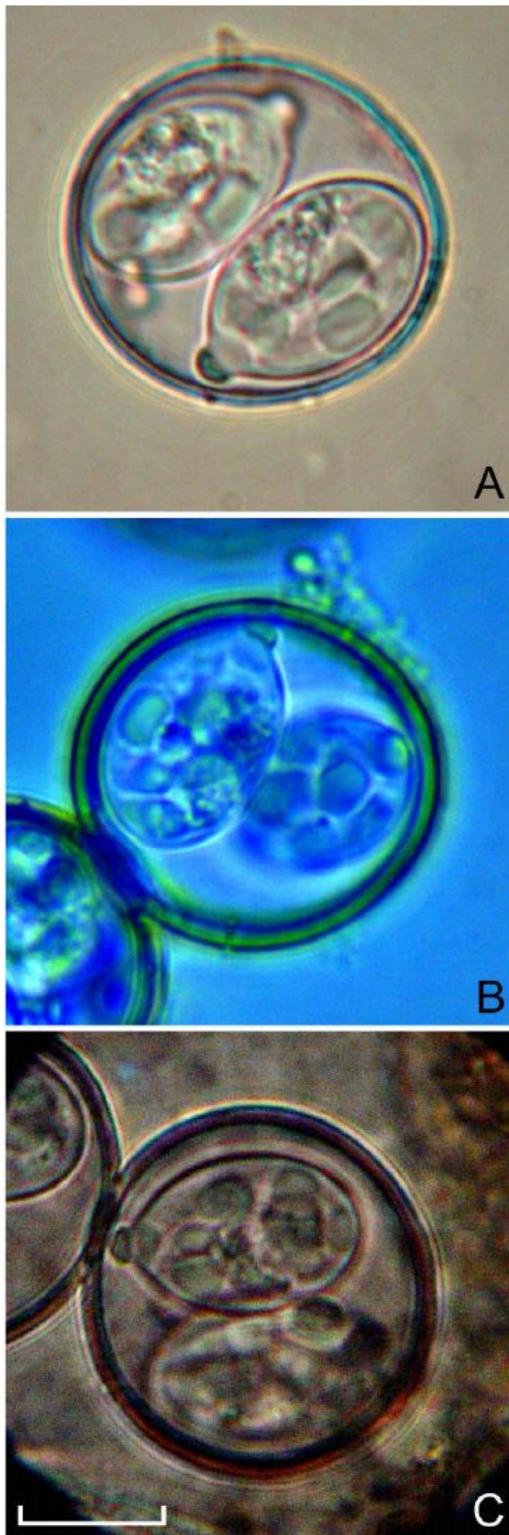


Fig. 1. Sporulated oocysts of *Isospora trincapferri* recovered from buff-throated saltators *Saltator maximus* (a, b) and green-winged saltators *Saltator similis* (c) (Berto et al. 2008). Scale-bar: 10 μ m.

1.62 (1.6-1.7). Stieda body bubble-shaped, 1.5 high \times 2.5 wide. Substieda body large and rounded, 2.5 high \times 3.5 wide. Parastieda body absent. Sporocyst residuum composed of scattered or clustered granules. Sporozoites vermiform, with refractile bodies at both ends. These oocysts had the same characteristic features of the oocysts of *I. trincapferri* described from *S. similis* (Table 1, Fig. 1)

The oocysts of *I. trincapferri* from the original description were recovered from green-winged saltators *S. similis* possibly captured at some moment from the wild. These saltators were caged in a breeding in the mountainous region of Rio de Janeiro. In this sense, this finding evidenced the role of the traffic of wild passerines (biopiracy) and reintroduction by centers screening of wild animals on the coccidial transmission. Berto & Lopes (2013) claim that the trade of birds should enhance the transmission of its coccidia among species of the same family. Besides, the centers screening of wild animals become more important since the failure to identify a parasite of a bird seized, followed by their release in the wild, different from its original, would provide the introduction of a new parasite to susceptible hosts.

Finally, in the current study, a new host for *I. trincapferri* is recorded, once that feature-similar oocysts were recovered from buff-throated saltators *S. maximus* kept under quarantine in preparation for reintroduction.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) to B. P. Berto (E-26/110.987/2013). We are thankful to CETAS/IBAMA (Centro de Triage de Animais Silvestres - Center for Triage of Wild Animals)/Ministério do Meio Ambiente at the municipality of Seropédica, who enabled our collect samples from birds held to rehabilitation and reintroduction into the wild.

References

Berto BP, Balthazar LMC, Flausino W, Lopes CWG. Two new coccidian parasites of green-winged saltator (*Saltator similis*)

Table 1. Comparative morphology of *Isoospora trincaferri* recovered from *Saltator similis* and *Saltator maximus*.

Coccidia	Hosts	References	Oocysts				Sporocysts				Residuum
			Shape	Measurements (µm)	Shape index	Wall	Polar granule	Shape	Measurements (µm)	Stieda body	
<i>Isoospora trincaferri</i>	<i>Saltator similis</i>	Berto et al. (2008)	sub-spherical to ellipsoidal	26.2 × 23.6 (24-29 × 22-25)	1.1 (1.0-1.2)	bi-layered, present		17.5 × 11.5 (17-18 × 10-13)	bubble-shaped, ~ 1.7 x 2.7	large and prominent, ~ 2.8 x 4.2	diffuse
	<i>Saltator maximus</i>	current work	sub-spherical to ellipsoidal	25.0 × 24.0 (24-27 × 23-26)	1.04 (1.0-1.1)	bi-layered, present		18.4 × 11.4 (17-20 × 10-12)	bubble-shaped, ~ 1.5 x 2.5	large and rounded, ~ 2.5 x 3.5	diffuse

from South America. *Acta Protozoologica*, 47, 263-267, 2008.

Berto BP, Lopes CWG. Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In Ruiz L, Iglesias L. Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease. New York: Nova Science Publishers, 2013. p. 47-66.

CBRO. Lista das aves do Brasil. Rio de Janeiro: Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2011.

Coelho CD, Berto BP, Neves DM, Oliveira VMD, Flausino W, Lopes CWG. Oocyst shedding by green-winged-saltator (*Saltator similis*) in the diagnostic of coccidiosis and *Isoospora similis* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22, 64-70, 2013.

tologia Veterinária, 22, 64-70, 2013.

Duszynski DW, Wilber PG. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, 83, 333-336, 1997.

IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2013. <http://www.iucnredlist.org> [15-08-2013]

Lopes BB, Berto BP, Massad FV, Lopes CWG. *Isoospora vanriperorum* Levine, 1982 (Apicomplexa: Eimeriidae) in the green-winged saltator, *Saltator similis* Lafresnaye and D'Orbigny, 1837 (Passeriformes: Cardinalinae) in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16, 211-214, 2007.

Sick H. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

Anexo 10. BALTHAZAR, L.M. DE C.; LEAL P.D.S.; TEIXEIRA FILHO W.L.; LOPES. C.W.G. Cães sororreagentes a *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) atendidos em uma clínica veterinária na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(supl. 2): 48-51, 2013.

CÃES SORORREAGENTES A *Neospora caninum* (APICOMPLEXA: TOXOPLASMATINAE) ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA VETERINÁRIA NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO, RJ*

Lianna Maria de Carvalho Balthazar[†], Paulo Daniel Sant'Anna Leal[‡], Walter Leira Teixeira Filho[§] e Carlos Wilson Gomes Lopes[¶]

ABSTRACT. Balthazar L.M. de C., Leal P.D.S., Teixeira Filho W.L. & Lopes C.W.G. [Seropositive dogs for *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) in a Veterinary Clinic in the City of Rio de Janeiro, RJ.] Cães sororreagentes a *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) atendidos em uma clínica veterinária na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl.2): 00-00, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: liannavet@yahoo.com.br

This study aimed to determine the presence of antibodies against *Neospora caninum* and the distribution among the different age groups in dogs from Barra da Tijuca in the City of Rio de Janeiro, Brazil. Serum samples from 402 animals attended at CTI-Veterinário were analyzed by Immunofluorescence Antibody test (IFAT), using as cut off 1:50. The frequency of seropositive animals was 8.46 % (34/ 402). In the present study there was a significant difference ($p=0.014$) when was compared seropositivity animals according to different age groups where animals with ≤ 10 years old had 2.35 more choice of becoming infected when compared with young ones. The results show the first record of the exposure of dogs to *N. caninum* in the studied region.

KEY WORDS. *Neospora caninum*, dogs, age, frequency, RIFI, Rio de Janeiro.

RESUMO. O objetivo desse estudo foi verificar a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães procedentes da região da Barra da Tijuca, cidade do Rio de Janeiro, RJ, e determinar a soropositividade nas diferentes faixas etárias. Amostras de soro de 402 animais atendidos no CTIVeterinário foram analisadas através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando como ponto de corte 1:50. A frequência de animais soropositivos foi de 8,46% (34/402). No presente estudo observou-se diferença significativa ($p=0,014$) em relação à soropositividade em função da faixa etárias, onde animais com idade ≤ 10 anos tiveram 2,35 mais

chances de se tornarem infectados, quando comparados com animais mais novos. Os resultados obtidos evidenciam o primeiro relato da presença da exposição de cães a *N. caninum* na região estudada.

PALAVRAS-CHAVE. Cães, *Neospora caninum*, frequência, RIFI, Rio de Janeiro.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, intracelular obrigatório, formador de cisto. Este protozoário infecta canídeos domésticos e selvagens, ruminantes e equinos (McAllister et al. 1998). Todos os pro-

* Recebido em 11 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 12 de novembro de 2013.

[†] Médica-veterinária. MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Anexo 1 do Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. *Autora para correspondência, E-mail: liannavet@yahoo.com.br - bolsista FAPERJ.

[‡] Médico-veterinário. DSc. CTIVeterinário, Avenida das Américas, 3939, Shopping Esplanada - Bl.2 Lj. 1, Barra da Tijuca, RJ 22631-000, Brasil. E-mail: paulodaniel@ctiveterinario.com.br

[§] Biólogo, PhD. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: leira@ufrj.br

[¶] Médico-veterinário. PhD, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, 23897-970, RJ. E-mail: lopescw@ufrj.br - bolsista CNPq.

tozoários da família Sarcocystidae têm carnívoros como hospedeiros definitivos (HD) e uma ou mais espécies de possíveis presas como hospedeiros intermediários (HI). Assim como *Toxoplasma gondii*, necessita de dois hospedeiros. Cães, coiotes, dingos e lobos cinzentos foram os principais HD já confirmados para *N. caninum*, podendo eliminar oocistos nas fezes (McAllister et al. 1998, Gondim et al. 2004, Wapenaar et al. 2006, King et al. 2010, Dubey et al. 2011).

Hospedeiros definitivos e intermediários silvestres representam um importante papel na epidemiologia da neosporose, por contaminar o ambiente, ou servindo como reservatório, influenciando consideravelmente a ocorrência da doença nos animais domésticos (Sobrino et al. 2008, Reiterová et al. 2009, André et al. 2010, Goodswen et al. 2013).

Em casos de cães portadores de *N. caninum*, observaram-se a concomitância de outros agentes etiológicos (Bresciani et al. 2007, Guimarães et al. 2009, Coelho et al. 2013), onde a imunossupressão natural ou iatrogênica pode acentuar a infecção. A transmissão congênita é uma das formas mais importantes de infecção. Cadelas infectadas podem transmitir esse agente etiológico para os seus fetos e, ninhadas sucessivas dessa mesma cadela podem nascer infectadas. Não existem evidências de que haja predisposição racial ou de sexo para essa enfermidade (Dubey & Lindsay 1996).

Cães de qualquer idade podem desenvolver sinais clínicos da neosporose (Bjerkas et al. 1984, Dubey 2003), entretanto, são em sua maioria hospedeiros assintomáticos (Pasquali et al. 1998). Porém, a neosporose clínica em animais adultos pode ocorrer em função da reativação de uma infecção anterior, associada a imunossupressão causada por vacinação com vírus atenuado. Entretanto, Barber & Trees (1996) indicaram que esse coccídio pode ser encontrado em vários órgãos (coração, pulmões e fígado) durante a fase aguda e somente restrita ao SNC, na fase crônica (Patitucci et al. 1997).

Não há relatos de casos da doença em humanos, embora já tenham sido detectados anticorpos para *N. caninum* em pacientes HIV positivo e evidência sorológica de exposição a *N. caninum* (Lobato et al. 2006), sem contudo associá-lo como uma infecção zoonótica.

O presente trabalho tem como objetivo verificar a frequência de anticorpos contra *N. caninum* através da RIFI em cães da Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, RJ, e determinar a importância

das diferentes faixas etárias como fator de risco ao agente etiológico estudado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 402 amostras da soroteca do Centro de Terapia e Emergência Veterinária Ltda (CTI Veterinário), situado na avenida das Américas, 3939 bloco 2 loja I, Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, RJ. Estas amostras foram obtidas atendendo aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais, de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal atendendo ao CEUA/IV/UFRRJ n. 044/2014. Os exames sorológicos e a análise dos dados obtidos foram realizados no Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC), DPA/IV/UFRRJ, Campus Seropédica, RJ.

No LCC, os soros foram acondicionados em criotubos de 2 ml, em duplicata, identificados e mantidos sob a temperatura de -20 °C até o momento da realização da sorologia. Foi utilizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Camargo, 1974) em microscópio triocular Epifluorescente modelo Lab. A1 Axio Zeiss (RFA) com ponto de corte de 1:50 (Dubey et al. 1998). As lâminas para realização da RIFI, com taquizoítas de *N. caninum*, foram obtidas da empresa IMUNÓDOT Diagnósticos Ltda (Ribeirão Preto, SP) e o conjugado (anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína da Sigma-Aldrich, (São Paulo, SP), diluição de 1:32 em PBS estéril com pH de 7,4.

Para análise estatística, um banco de dados foi montado com os questionários dos 402 animais, utilizando-se o programa Epi Info 7 (www.cdc.gov), no qual foi realizado o teste exato de Fisher (Sampaio 1998) com nível de significância estabelecido em 5%, para avaliar a associação da soropositividade em função da idade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães da Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, RJ. Através da RIFI, foram observados anticorpos contra *N. caninum* em 8,46% (34/402) dos animais. O percentual de animais positivos foi bem variado (Dubey & Lindsay 1996, Rasmussen & Jensen 1996, Sawada et al. 1998, Patitucci et al. 2001, Hornok et al. 2006, Reiterová et al. 2009), inclusive em diferentes regiões do Brasil. Souza et al. (2002) no Paraná observou que 21,6% dos cães da área rural; Azevedo et al. (2005) observaram que 8,4% dos cães de Campina Grande, PB; Cunha Filho et al. (2008) em Pelotas, RS, 5,5% (6/109) nos cães urbanos; Lavras, MG, Guimarães et al. (2009) encontraram 3,1% de animais positivos; na região da Serra de Botucatu, SP, Moraes et al. (2008) observaram 25,8%, enquanto que Benetti et al. (2008) em Cuiabá, MT, detectaram a presença deste agente etiológico em 45% dos animais. Essa variação foi menos acentuada em animais de áreas urbanas, inclusive em animais mantidos domiciliar-

mente como o observado neste trabalho.

Dos 402 animais avaliados, a idade se mostrou como um fator predisponente, pois quanto mais velhos os animais mais susceptíveis a exposição ao patógeno (Tabela 1). e, dentro os positivos, apenas dois dos animais tiveram sinais clínicos neurológicos.

Com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que em animais domiciliados a frequência de animais sororreagentes a *N.caninum* foi baixa, a pesar de baixa esta frequência aumentou com a idade, por se observar um maior número de animais positivos entre os mais velhos. Apesar de só haver dois dos animais sororreagentes a *N. caninum* com quadro clínico neurológico, seria recomendável a inclusão do diagnóstico desse agente etiológico no diagnóstico diferencial entre as doenças neurológicas em cães atendidos em clínicas veterinárias.

Tabela 1. Importância da faixa etária em cães sororreagentes a *Neospora caninum* na região metropolitana do Rio de Janeiro, RJ.

Características	Animais		Valor de p	RR ^a	IC 95% ^b
	Sorologia ^c	Valores			
3 meses – ≤10 anos	Negativa:	249 (62) ^d	0,0221	1,082	1,007 a 1,162
	Positiva:	16 (04)			
>10 – 19 anos	Negativa:	19 (30)			
	Positiva:	18 (04)			
Total		402 (100)			

^a RR= Risco relativo; ^b Usando aproximação de Katz; ^c RIFI; ^d Valores relativos em percentagem.

Agradecimentos. Ao CTI-Veterinário por ceder gentilmente a soroteca e as informações clínicas dos 402 cães para serem utilizadas nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andre M.R., Adania C.H., Teixeira R.H.F., Silva K.F., Jusi M.M.G., Machado S.T.Z., de Bortolli C.P., Falcade M., Sousa L., Alegretti S.M., Felipe P.A.N., & Machado R.Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Captive Neotropical and Exotic Wild Canids and Felids. *J. Parasitol.*, 96:1007-1009, 2010.

Azevedo S.S., Batista C.S.A., Vasconcellos S.A., Aguiar D.M., Ragozo A.M.A., Rodrigues A.A.R., Alves C.J. & Gennari S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res. Vet. Sci.* 79(1):51-56, 2005.

Barber J.S. & Trees A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Rec.*, 139:439-443, 1996.

Benetti A.H., Toniollo G.H., Santos T.R., Gennari S.M., Costa A.J. & Dias R.A. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora Caninum* em cães no Município de Cuiabá, Mato Grosso. *Cienc. Anim. Bras.*, 9:177-180, 2008.

Bjerkas L., Mohn S.F. & Presthus J. Unidentified cyst-form-

ing Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenk.*, 70:271-274, 1984.

Bresciani K.D.S., Costa A.J., Nunes C.M., Serrano A.C.M., Moura A.B., Stobbe N.S., Perri S.H.V., Dias R.A. & Gennari S.M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. *Ars Vet.*, 23:40-46, 2007.

Camargo M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clin.* 10:143169, 1974.

Coelho W.M.D., Apolinário Coelho J., Teixeira W.F.P., Coelho N.M.D., Oliveira G.P., Lopes W.D.Z., Cruz B.C., Maciel W.G., Soares V.E. & Bresciani K.D.S. Detection of co-infections by *Leishmania (L.) chagasi*, *Trypanosoma evansi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. *Ars Vet.*, 29:169-174, 2013.

Cunha Filho N.A., Lucas A.S., Pappen F.G., Ragozo A.M.A., Gennari S.M., Lúcia Junior T. & Farias N.A.R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, BRASIL. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17(supl.1):301-306, 2008.

Dubey J.P. & Lindsay D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67:1-59, 1996.

Dubey J.P., Hattel A.L., Lindsay D.S. & Topper M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193:1259-1263, 1988.

Dubey J.P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41:1-16, 2003.

Dubey J., Jenkins M., Rajendran C., Miska K., Ferreira L., Martins J., Kwok O. & Choudhary S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 181:382-387, 2011.

Gondim L.F.P., McAllister M.M., Pitt W.C. & Zemlicka D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definite hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 34:159-161, 2004.

Goodswen S., Kennedy P. & Ellis J. A Review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect. Gen. Evol.*, 13:133-150, 2013.

Guimarães A.M., Rocha C.M.B.M., Oliveira T.M.F.S., Rosado I.R., Morais L.G., Santos R.R.D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(supl. 1):49-53, 2009.

Hornok S., Edelhofer R., Fok É., Berta K., Fejes P., Répási A. & Farkas R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. *Vet. Parasitol.*, 137:197-201, 2006.

King J.S., Šlapeta J., Jenkins D.J., Al-Qassab S.E., Ellis J.T. & Windsor P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 40:945-950, 2010.

Lobato J., Silva D.A.O., Mineo T.W.P., Amaral J.D.H.F., Segundo G. R.S., Costa-Cruz J.M., Ferreira M.S., Borges A.S. & Mineo J.R. Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clini. Vac. Immunol.*, 13:84-89, 2006.

McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R.,

- Wills R.A. & McGuire A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 28:1473-1478, 1998.
- Moraes C.C.G., Megid J., Pituco E.M., Okuda L.H., Del Fava C., de Stefano E. & Crocci A.J. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 3(17):1-6, 2008.
- Pasquali P., Mandara M.T., Adamo F., Ricci G., Polidori G.A. & Dubey J.P. Neosporosis in a dog in Italy. *Vet. Parasitol.*, 77:297-299, 1998.
- Patitucci A.N., Pérez M.J., Rozas M.A. & Israel K.F. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. *Arch. Med. Vet.*, 33:227-232, 2001.
- Rasmussen K. & Jensen A.L. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Vet. Parasitol.*, 62:345-349, 1996.
- Reiterová K., Špilovská S., Antolová D. & Dubinský P. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: The current serological follow-up in Slovakia. *Vet. Parasitol.*, 159:1-6, 2009.
- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. FEPMVZ, Belo Horizonte, 1998. 221p.
- Sawada M., Park C.H., Kondo H., Morita T., Shimada A., Yamane I. & Umemura T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 60:853-854, 1998.
- Sobrino R., Dubey J.P., Pabón M., Linarez N., Kwok O.C., Millán J., Arnal M. C., Luco D. F., López-Gatius F., Thulliez P., Gortázar C. & Almería S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.*, 155:190-194, 2008.
- Souza S.L.P., Guimarães Jr J.S., Ferreira F., Dubey J.P. & Gennari S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana. *J. Parasitol.*, 88:408-409, 2002.
- Wapenaar W., Jenkins, M.C., O'Handley R.M. & Barkema H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *J. Parasitol.*, 92:1270-1274, 2006.
- Guimarães A.M., Rocha C.M.B.M., Oliveira T.M.F.S., Rosado I.R. Morais L.G. & Santos R.R.D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18(supl. 1):49-53, 2009.



ESAMV à UFRRJ
100 anos de educação