

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Sarcocystis* spp.
E INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE
TRANSMISSÃO VERTICAL POR *Sarcocystis neurona* EM
EQUINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Maria Antonello
Santa Maria, RS, Brasil
Janeiro, 2013

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Sarcocystis* spp. E INVESTIGAÇÃO
DA OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL POR *Sarcocystis neurona*
EM EQUINOS.**

por

Ana Maria Antonello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Sarcocystis* spp. E INVESTIGAÇÃO
DA OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL POR *Sarcocystis neurona*
EM EQUINOS.**

elaborada por
Ana Maria Antonello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)

Luís Antonio Sangioni, Dr (UFSM)

Larissa Picada Brum, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 22 de Janeiro, 2013.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família, pelo incentivo e compreensão, afeição e sinceridade no decorrer do curso.

Muito obrigada à minha orientadora Fernanda Vogel, pela confiança depositada ao aceitar me orientar, confiança esta por vezes maior que a minha própria.

Muito obrigada também aos colegas e amigos do LADOPAR, que foram essenciais para o desenvolvimento do projeto, pelas contribuições, pelos bons e alegres momentos compartilhados e excelente ambiente de cooperação, pelos erros e acertos no decorrer da caminhada, pelo apoio e dedicação no período de trabalho em todas as etapas deste estudo. Em especial à Giovana e Patrícia, pelo apoio e conselhos e ao Felipe pela grande ajuda, troca de ideias e conhecimentos no decorrer do mestrado.

Agradeço também aos professores e ao pessoal do Setor de Virologia, Labac e do Biorep, pela disponibilidade dos equipamentos e materiais, que foram essenciais para o desenvolvimento de diversos trabalhos no decorrer do mestrado, e também pelas colaborações nos experimentos e pela amizade demonstrada.

Minha gratidão também à UFSM e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade e estrutura disponibilizadas para desenvolver o mestrado e às agências Financiadoras CAPES e CNPq, que apoiaram este projeto.

It is not our abilities that show us what we truly are, it's our choices.

Albus Dumbledore (J. K. Rowling – *Harry Potter*)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Sarcocystis* spp. E INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL POR *Sarcocystis neurona* EM EQUINOS.

AUTOR: ANA MARIA ANTONELLO

ORIENTADOR: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL

Santa Maria, 22 de Janeiro, 2013.

A mieloencefalite equina por protozoário (MEP) é causada principalmente por *Sarcocystis neurona*. O hospedeiro definitivo de *S. neurona* é o gambá (*Didelphis* spp.), que se infecta ingerindo esporocistos dos tecidos dos hospedeiros intermediários, que pertencem a diversas espécies. Os sinais clínicos cursam com sinais neurológicos, que variam conforme a área do sistema nervoso afetada. A doença clínica não é comum, porém casos de imunossupressão como senilidade, estresse, uso de corticoides podem levar ao desenvolvimento dos sinais clínicos. Do ponto de vista epidemiológico, é interessante determinar a distribuição geográfica do protozoário a fim de se conhecer as áreas onde os animais foram expostos a *S. neurona* por meio de testes sorológicos, a fim considerar a MEP no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas e direcionar o tratamento. Nos EUA estima-se que metade dos equinos seja reagentes para *S. neurona*, no Brasil não há muitos relatos sobre prevalência de equinos soropositivos. A infecção transplacentária já foi descrita para outras espécies de *Sarcocystis*, porém ainda não há evidências da infecção intrauterina pelo *S. neurona*, somente alguns estudos que sugerem a transmissão vertical como outra forma de manutenção do agente, o que poderia ser confirmada pela detecção de anticorpos no soro do neonato antes da ingestão do colostro. Enquanto o *S. neurona* é o principal agente da mieloencefalite equina, a infecção por *S. cruzi* está relacionada a prejuízos em bovinos. Apesar dos parasitas apresentarem ciclo de vida distintos, com hospedeiros definitivos diferentes, equinos estão expostos a ambas espécies de *Sarcocystis*, sendo que as duas espécies podem infectar equinos e se disseminar concomitantemente nos plantéis. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo detectar a ocorrência da transmissão transplacentária por *S. neurona* em equinos e comparar a soroprevalência dos plantéis frente a *S. neurona* e *S. cruzi*. Os resultados encontrados foram dispostos em dois

capítulos. No capítulo um, investigou-se a ocorrência de infecção transplacentária de *S. neurona* em éguas. Para tal foi coletado sangue desses animais e seus neonatos para a pesquisa de anticorpos contra *S. neurona*. No segundo capítulo, comparou-se, por imunofluorescência indireta, amostras sorológicas de 189 éguas quanto a presença de anticorpos contra *Sarcocystis* spp. utilizando como antígeno *S. neurona* e *S. cruzi*. Na análise dos resultados revelou a maioria dos animais reagindo a antígenos de *S. cruzi* e um terço dos animais soropositivos reagiu a antígenos das duas espécies.

Palavras-chave: mieloencefalite equina por protozoário, desafio endógeno, soroprevalência.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

DETECTION OF ANTIBODIES *Sarcocystis* spp. AND OCCURRENCE INVESTIGATION OF VERTICAL TRANSMISSION FOR HORSES IN *Sarcocystis neurona* IN EQUINE.

AUTHOR: ANA MARIA ANTONELLO

ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL

Santa Maria, January, 22nd, 2013.

The equine protozoal mieloencefalite (EPM) is caused mainly by *Sarcocystis neurona*. It's definitive host is the opossum (*Didelphis* spp.), which becomes infected by ingesting sporocysts from tissues of intermediate hosts, that belong to different species. Clinical manifestations occur with neurologic signs, which vary according to the area of the nervous system affected. Clinical disease is not common, however cases of immunosuppression as senility, stress, use of corticosteroids may lead to development of clinical signs. From an epidemiological standpoint, it is interesting to determine the distribution of the protozoa in order to know the areas where animals were exposed to *S. neurona* through serological tests, in order to consider EPM in differential diagnosis of neurological diseases and guide the treatment. In the U.S. it is estimated that half of the horses are reagents for *S. neurona*, in Brazil there are not many reports about prevalence of seropositive horses. The transplacental infection has been described for other species of *Sarcocystis*, however there is no evidence of intrauterine infection by *S. neurona*, only some studies suggesting the vertical transmission as another way of agent maintenance, which could be confirmed by detecting antibodies in sera from neonates before colostrum ingestion. While *S. neurona* is the primary agent of equine mieloencefalite, *S. cruzi* is related to losses in cattle. Although parasites present similar life cycle, but with different definitive hosts, horses were exposed to both species of *Sarcocystis*, and these two species may infect horses and spread concurrently in herds. Therefore, this study aimed to detect the occurrence of transplacental transmission by *S. neurona* in horses and compare the prevalence of flocks against *S. neurona* and *S. cruzi*. Results were arranged in two chapters. In chapter one, we investigated the occurrence of transplacental infection of *S. neurona* in horses. For this, blood was collected from mares and their newborns for antibodies against *S. neurona*. In the second chapter, we compared, by indirect immunofluorescence, serum samples from 189 mares for the presence of antibodies against *Sarcocystis* spp. using as antigen *S. neurona*

and *S. cruzi*. The analysis of the results revealed the majority of animals responding to antigens of *S. cruzi* and a third of seropositive animals reacted to antigens of both species.

Key words: equine protozoal meningoencephalitis, endogenous challenge, seroprevalence.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Detecção de imunoglobulinas anti-*S. neurona* em amostras séricas de éguas e de potros por imunofluorescência indireta (IFI).29

Tabela 2: Níveis de IgG contra *S. neurona* das amostras das éguas testadas por IFI e a frequência de potros soropositivos conforme o título das éguas..... 30

CAPÍTULO II

Tabela 1: Detecção de imunoglobulinas anti-*S. neurona* e anti-*S. cruzi* em amostras séricas de éguas por imunofluorescência indireta (IFI).....42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. CAPÍTULO I <u>-</u> TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA POR <i>Sarcocystis neurona</i> EM EQUINOS	16
Resumo.....	16
Abstract	17
Introdução.....	18
Materiais e métodos	19
Resultados	21
Discussão.....	22
Referências bibliográficas	25
3. CAPÍTULO II <u>-</u> INVESTIGAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA <i>Sarcocystis Neurona</i> E <i>Sarcocystis Cruzi</i> EM EQUINOS	31
Resumo.....	31
Abstract	32
Introdução.....	33
Materiais e métodos	35
Resultados e discussão	37
Conclusões	39
Referências bibliográficas	39
4. CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Equinos podem servir de hospedeiros intermediários para várias espécies de *Sarcocystis*. Além de *Sarcocystis neurona*, agente da Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP) (DUBEY et al, 2001a), *Sarcocystis fayeri*, *Sarcocystis equicanis* e *Sarcocystis bertrami* também estão relacionadas a infecções nesta espécie (DUBEY e LINDSEY, 2006). Além disso, *Sarcocystis cruzi*, espécie relacionada a bovinos, já foi descrita em tecidos equinos, no entanto publicações acerca da infecção por *S. cruzi* em equinos e sua importância clínica são escassas (HAMIR et al., 1993).

Sarcocystis neurona, além de ser agente da MEP, possui uma ampla gama de hospedeiros intermediários incluindo, além de equinos, membros de diversas espécies animais (ELSHEIKHA, 2009), o protozoário completa seu ciclo em gambás (*Didelphis* sp.), hospedeiros definitivos (FENGER et al., 1995; DUBEY et al, 2001b; REJMANEK et al, 2009). A habilidade do *S. neurona* de utilizar diversos hospedeiros intermediários é um dos maiores obstáculos para o controle do parasito (ELSHEIKHA, 2009).

A distribuição da MEP acompanha a distribuição geográfica do hospedeiro definitivo de *S. neurona* (*Didelphis* spp.) (DUARTE et al., 2003; DUBEY, 2000), ocorrendo principalmente nas Américas, em países como Estados Unidos, Brasil e Argentina (DUBEY et al., 1999; DUBEY et al., 2001a; HOANE et al., 2006). Casos de MEP também foram diagnosticados em países da Europa, África e Ásia, porém em animais importados do hemisfério oeste (MAYHEW & GREINER, 1986; RONEN, 1992; LAM et al., 1999). Nos Estados Unidos, estima-se que aproximadamente metade dos equinos sejam reagentes a *S. neurona* (FENGER et al., 1995). No Brasil já foi relatado 69,6% de equinos soropositivos (HOANE et al., 2006). Em outro estudo, no

Rio Grande do Sul, 18 de 27 animais com histórico de sinais neurológicos eram reagentes para *S. neurona*, sendo que sete destes animais nasceram e foram criados no local (LINS et al., 2008), o que demonstra a exposição dos equinos brasileiros ao protozoário.

Merozoítos *S. neurona* se alojam no sistema nervoso central do equino e os sinais clínicos dependem da área acometida (DUBEY et al., 2001a), podendo incluir claudicação, hipermetria, reações atrasadas, ataxia desvio da cabeça, tremorese atrofia muscular. (FENGER et al., 1997; KUBO et al., 2010). Apesar da alta prevalência nos casos relatados, a doença clínica não é comum, porém a imunossupressão causada pelo estresse, principalmente em criações intensivas, ou o uso de corticoides são descritos como fatores agravantes na evolução clínica da doença (COOLEY et al., 2007). O risco de doença clínica é maior quando há comprometimento da saúde do animal, como senilidade, excesso de exercícios, transporte, injúria ou parto que levam a imunossupressão e conseqüente desenvolvimento de sinais clínicos de MEP. Cavalos de alta performance têm mais chance de desenvolver sinais clínicos que cavalos de lazer e reprodutores, esta diferença está ligada principalmente a intensidade de exercícios (SAVILLE et al., 2000).

O diagnóstico clínico da MEP é presuntivo, baseado nos sinais clínicos neurológicos sugestivos juntamente com a sorologia positiva do animal. Devido à existência de um tratamento eficaz (MACKAY, 2006), é importante ter conhecimento dos locais em que os animais são expostos ao parasita, para que seja considerada a MEP nos diagnósticos diferenciais de doenças neurológicas e se direcione a um tratamento eficaz. O custo desse tratamento pode se tornar elevado devido ao seu período prolongado, tornando a prevenção e o controle os melhores métodos para minimizar os prejuízos da doença. O Western blot (WB), um imunoblot, é o teste sorológico de referência para o diagnóstico sorológico da infecção por *S. neurona*. Porém atualmente outros testes sorológicos foram desenvolvidos para este fim, como o Teste de Aglutinação (SAT) (LINDSAY & DUBEY, 2001), o teste de ELISA com antígenos de superfície

de *S. neurona* (SnSAG-ELISA) (HOANE et al., 2005) e o Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), com sensibilidade e especificidade equivalente ao Western Blot, porém de menor complexidade. (JOHNSON et al., 2010).

Em relação ao gênero *Sarcocystis*, a infecção transplacentária foi demonstrada em bovinos, (MORÉ et al., 2009), mas ainda não em equinos (COOK et al., 2001; DUARTE et al., 2004). No entanto, outros protozoários do filo apicomplexa são capazes de estabelecer infecção endógena em equinos, como *Neospora spp.* (LOCATELLI -DITTRICH et al., 2006; PUSTERLA et al., 2011; ANTONELLO et al., 2012) e *Toxoplasma gondii* (BUXTON & RODGER, 2008). Assim, é importante a determinação da ocorrência infecção transplacentária em equinos por *S. neurona*, o que pode ser feito por meio da detecção do parasita, de antígenos ou de ácidos nucleicos em fetos abortados ou em animais recém-nascidos. Outra forma seria pela detecção de anticorpos em amostras de soro fetal ou de neonatos desprovidos de colostro uma vez que não há passagem de imunoglobulinas pela placenta da égua (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Esta última é uma forma mais prática e igualmente segura, com a vantagem de preservar a gestação até o final e a possibilidade de avaliar tanto material do recém-nascido como da mãe.

Além da proximidade filogenética com protozoários em que a infecção transplacentária já foi confirmada, há ainda publicações que induzem a acreditar que haja exposição intrauterina a *S. neurona*. Foi relatado um potro com sinais sugestivos de MEP aos dois dias de idade e positivo para Western blot do líquido cérebro-espinhal aos dois meses de idade, que nasceu de uma égua soropositiva para *S. neurona* (GRAY et al., 2001). Fato que sugere que a infecção do potro foi pela via transplacentária, uma vez que a soroconversão ocorre aproximadamente 30 dias após uma infecção (CUTTLER et al., 2001). Além disso, o feto equino é capaz de formar uma resposta imune humoral em torno dos 180 dias de gestação (PERRYMAN et al., 1980). Se exposto ao protozoário após esse período, anticorpos estarão presentes no soro do neonato mesmo antes deste

ingerir o colostro. Outro fato interessante é a ocorrência de equinos soropositivos em áreas onde não há a presença do hospedeiro definitivo de *S. neurona*, mesmo esses animais reativos nunca terem saído do local de origem, como é o caso de equinos nascidos na França, que não tiveram contato com o *Didelphis* (PITEL et al., 2002), tal fato sugere ou a existência de um hospedeiro definitivo desconhecido ou outra forma de manutenção do agente, que poderia ser a transmissão endógena, a partir de mães infectadas.

Outra espécie de *Sarcocystis*, esta relacionada a bovinos, *Sarcocystis cruzi*, já foi descrita em equinos, no entanto publicações acerca da infecção por *S. cruzi* em equinos e sua importância clínica são escassas, mesmo esta espécie também sendo capaz de formar sarcocistos nos tecidos de equinos (HAMIR et al., 1993). Já em bovinos, são comuns relatos de patogenia e prevalência da infecção, podendo alcançar quase 100% de animais infectados em amostras de abatedouros (MORÉ et al., 2011). *S. cruzi*, em bovinos, está associado a lesões musculares e menor ganho de peso (MORÉ et al., 2010). O ciclo de vida dos dois protozoários é distinto, *S. cruzi* tem cães como hospedeiros definitivos, e bovinos como principal hospedeiro intermediário, formando sarcocistos no tecido muscular. Em ambos os casos, o equino pode adquirir o protozoário ingerindo esporocistos presentes no ambiente, já a infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de tecidos infectados e consequente liberação de esporocistos nas fezes, contaminando o ambiente (FENGER et al., 1995; DUBEY et al., 2001a; XIANG et al., 2011).

Este estudo foi dividido em dois capítulos a fim de discutir separadamente a ocorrência da transmissão vertical por *S. neurona* em equinos e a detecção de anticorpos contra *S. neurona* e *S. cruzi* nos animais. Diante dos fatos que sugerem a rota transplacentária de infecção por *S. neurona* em equinos, somados à amplitude da gama de hospedeiros, que é um fator limitante no controle da infecção, foi realizada uma investigação sorológica em éguas e seus respectivos potros, antes da ingestão do colostro, com o intuito de detectar a ocorrência da transmissão vertical nesta espécie,

descrito no capítulo um. No segundo capítulo foi feita a comparação sorológica de éguas frente a antígenos de *S. neurona* e *S. cruzi*, como as duas espécies são capazes de infectar e estimular uma resposta imune em equinos e têm condições de manterem-se de forma concomitante no mesmo ambiente.

2. CAPÍTULO I

TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA POR *Sarcocystis neurona* EM EQUINOS

TRANSPLACENTARY TRANSMISSION OF *Sarcocystis neurona* IN HORSES

(Artigo submetido ao periódico *Veterinary Parasitology*)

Ana Maria Antonello^{I*}, Felipe Lamberti Pivoto¹, Giovana Camillo¹, Patricia Braunig¹, Luis Antonio Sangioni¹, Endrigo Pompermayer^{II}, Luís Fernando Pita Gondim^{III}, Fernanda Silveira Flores Vogel¹

RESUMO

Sarcocystis neurona é um protozoário intracelular filogeneticamente relacionado ao *Toxoplasma gondii* e *Neospora* sp. e é o principal agente responsável pela mieloencefalite equina por protozoário (MEP), uma doença neurológica que acomete equinos diferentes partes do mundo. Tendo em vista a proximidade filogenética a protozoários que têm infecção transplacentária comprovada e trabalhos que sugerem a mesma via de transmissão em equinos, neste estudo foi avaliada a presença de anticorpos contra *Sarcocystis neurona* em 195 éguas no momento do parto e de seus respectivos neonatos antes da ingestão do colostro, a fim de verificar a ocorrência da

^I Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone (55)3220 8071. E-mail: ana_antonello@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^{II} Equine Hospital, Qatar Racing & Equestrian Club, Doha, Qatar.

^{III} Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

transmissão transplacentária nesta espécie. As amostras foram analisadas pela técnica de imunofluorescência indireta ao ponto de corte de 1:50 nos animais adultos e 1:25 nos recém-nascidos. Foram observados potros pré-colostrais reagentes a antígenos de *S. neurona*, indicando a ocorrência de infecção transplacentária por *S. neurona* na espécie equina.

Palavras-chave: Mieloencefalite Equina por Protozoário, infecção transplacentária, desafio endógeno, soroprevalência.

ABSTRACT

Sarcocystis neurona is an intracellular protozoal closely related to *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. and it is the main agent of equine protozoal myeloencephalitis (EPM), a neurologic disease that affect horses around the world. In view of the phylogenetic proximity to protozoa that have proven transplacental infection and studies suggesting the same transmission rote in horses, in this study the presence of antibodies against *Sarcocystis neurona* was determined in 195 mares at parturition and in their foals before the colostrum ingestion, to verify the occurrence of transplacental transmission in this animal species. Samples were analyzed by indirect immunofluorescent test using 1:50 and 1:25 as cutoffs for mare and foal sera, respectively. Positive reactions were observed in foal precolostral sera, showing the vertical rote of *S. neurona* dissemination in horses.

Keywords: Equine Protozoal Myeloencephalitis, transplacental infection, endogen challenge, seroprevalence.

INTRODUÇÃO

Sarcocystis neurona é descrito como o principal agente da mieloencefalite equina por protozoário (MEP) (MACKAY et al., 2000), uma enfermidade de cunho neurológico, infecciosa e muitas vezes fatal (MAYHEW, 1999). O protozoário tem tropismo pelo sistema nervoso central do equino, cujos sinais clínicos dependem da região acometida (DUBEY et al., 2001b), sendo o mais conhecido, em equinos, atrofia muscular (FENGER et al., 1997; KUBO et al., 2010).

O hospedeiro definitivo de *S. neurona* é o gambá (*Didelphis* sp.) (FENGER et al., 1995; DUBEY et al., 2001b; REJMANEK et al., 2009), que se infecta ao ingerir sarcocistos presentes na musculatura do hospedeiro intermediário e excreta esporocistos juntamente com as fezes. A gama de hospedeiros intermediários de *S. neurona* é ampla, incluindo membros de diferentes famílias como felídeos, canídeos, mustelídeos, castores, e ainda primatas e passeriformes, sendo um dos maiores obstáculos no controle do parasito (ELSHEIKHA, 2009).

O diagnóstico clínico da MEP é presuntivo, baseado nos sinais clínicos e na sorologia, por isso a importância de conhecer as áreas de ocorrência do protozoário, a fim de considerar a MEP no diagnóstico diferencial de enfermidades neurológicas (JOHNSON et al., 2010). Apesar da alta prevalência, a doença clínica não é comum. Cavalos de exposição e corrida têm mais chances de adoecer que cavalos de lazer e reprodutores, devido ao tratamento mais intensivo desses animais. O risco de doença também aumenta devido a outros fatores como senilidade, excesso de exercícios, transporte, injúria ou parto, que levam a imunossupressão e consequente desenvolvimento de sinais clínicos de MEP. (SAVILLE et al., 2000; COOLEY et al., 2007).

A distribuição da MEP ocorre de acordo com a distribuição dos hospedeiros definitivos de *S. neurona* (*Didelphis* sp.), presente nas Américas (DUARTE et al., 2003; DUBEY, 2000). Porém casos de MEP já foram diagnosticados na Europa, África e Ásia, no entanto, em animais que

foram importados de países do hemisfério ocidental (MAYHEW & GREINER, 1986; RONEN, 1992; LAM et al., 1999).

Devido à proximidade filogenética de *S. neurona* com outros protozoários formadores de cistos e de transmissão vertical comprovada, além da existência de estudos que sugerem a via endógena de transmissão de *S. neurona* em equinos, o objetivo do presente estudo foi examinar o potencial da exposição intrauterina a *S. neurona* determinando o número de potros que possuam concentrações detectáveis de anticorpos contra *S. neurona* no soro antes da ingestão do colostro e, desta forma, esclarecer melhor a epidemiologia e rotas de transmissão, o que leva ao aprimoramento das estratégias de controle da MEP em equinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de soro foram coletadas de 195 éguas Puro Sangue Inglês (PSI) e de seus respectivos neonatos em dois haras do Rio Grande do Sul, Brasil. As propriedades são localizadas na região Sudoeste do Estado, onde há registros da presença do gambá (*Didelphis* sp.), hospedeiro definitivo de *S. neurona*. Os animais foram monitorados rotineiramente por um médico veterinário e todos partos eram assistidos. A coleta de sangue foi realizada imediatamente após o parto nas éguas e, nos recém-nascidos, antes da ingestão do colostro. Após a coleta, o sangue total foi centrifugado a 250g por 10 minutos para a obtenção do soro sanguíneo, que foi estocado a -20°C até o momento do teste.

Deteção de anticorpos

A pesquisa de imunoglobulinas G (IgG) anti-*Sarcocystis neurona* foi realizada utilizando-se a técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Como antígeno foram utilizados merozoítos de *S. neurona* da cepa SN-37R (SOFALY et al., 2002) cultivados em células da linhagem CV-1, com meio RPMI, enriquecido com 5% de soro fetal bovino, L-glutamina, piruvato, penicilina, estreptomicina e anfotericina. Para preparar as lâminas de IFI, a monocamada celular infectada foi coletada dos frascos de cultivo, centrifugada a 1500g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o *pellet*, ressuspensão em solução salina fosfatada (PBS) e centrifugada novamente. O *pellet* final foi ressuspensionado em PBS e dispensado em lâminas de *teflon*, após a secagem à temperatura ambiente, os merozoítos foram fixados nas lâminas com metanol 100%, secas e estocadas a -20°C até o momento do uso.

Para a realização da IFI com as amostras de soro das éguas foi usado um ponto de corte de 1:50 para a triagem, enquanto os potros foram considerados positivos na diluição 1:25. Anticorpo anti-IgG equina conjugado a fluoresceína foi usado como anticorpo secundário na reação. Amostras de soro sabidamente positiva e negativa quanto à presença de anticorpos contra *S. neurona* foram utilizadas como controles positivo e negativo respectivamente, em cada lâmina. Foram consideradas positivas, as amostras em que houve fluorescência em toda a superfície dos merozoítos de *S. neurona* e negativas as amostras em que a fluorescência era apical ou ausente (DUARTE et al., 2003). Após a obtenção dos resultados positivos e negativos da IFI, as amostras das éguas positivas foram tituladas, o título foi determinado pela máxima diluição em que era observada a fluorescência.

Análise estatística

A análise estatística da prevalência sorológica das éguas e dos potros pré-colostrais e a comparação da frequência de transmissão vertical de acordo com o título da égua foi realizada

usando a tabela de contingência do Qui-quadrado (χ^2) e o valor de P, para avaliar a diferença estatística, pelo teste de Fisher (GraphPad Prism 5[®]).

Comitê de ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, cujo processo está registrado sob o número 81/2009.

RESULTADOS

Para determinar a ocorrência de transmissão vertical por *S. neurona* em equinos, foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*S. neurona* em éguas e seus respectivos potros pela técnica de IFI. Como se observa na tabela 1, a frequência de detecção de imunoglobulinas G (IgG) em éguas foi significativamente maior que a dos potros (32,82% - 64/195- nas éguas e 5,13% - 10/195 - nos potros) ($X^2= 6,608$, IC=95%; $P<0,05$). As amostras das 64 éguas soropositivas na diluição de 1:50 foram então tituladas, os níveis de anticorpos variaram de 50 a 800, a maioria dos animais apresentou títulos mais baixos. Após a análise estatística destes dados, não foi observada diferença na probabilidade de infecção transplacentária quando o parâmetro avaliado é o título de anticorpos maternos (tabela 2).

Comparando a detecção de anticorpos nas amostras pré-colostrais dos potros, sete animais soropositivos nasceram de fêmeas soropositivas. Três potros sororreagentes, no entanto, nasceram de éguas com títulos inferiores a 50 (consideradas negativas).

DISCUSSÃO

Sarcocystis neurona é o principal agente da MEP e tem maior importância clínica em animais de todo mundo. A gama de hospedeiros do protozoário é grande, o que torna difícil o seu controle nos plantéis. A fim de se investigar a ocorrência da transmissão transplacentária por *S. neurona*, avaliou-se a presença de imunoglobulinas no soro de éguas no momento do parto e de seus neonatos antes da ingestão do colostro pela técnica de IFI.

A prevalência entre as éguas foi de 32,82% (64/195), valor inferior ao encontrado por HOANE et al. (2006) que detectaram 69,6% de animais reagentes no Brasil. No entanto, semelhante a outros estudos da América onde foi descrito 35,5% na Argentina (DUBEY et al., 1999) e 27,4% em diferentes regiões dos Estados Unidos, sendo que a soroprevalência varia conforme a região e o grupo de animais avaliados (VARDELEON et al., 2001).

A avaliação dos resultados dos testes sorológicos em equinos jovens, quanto à presença de imunoglobulinas contra *S. neurona* deve ser cautelosa, pois pode estar relacionada à exposição intrauterina, à transferência passiva de anticorpos maternos, ou ainda à infecção por ingestão de esporocistos do protozoário. Ainda não há relato da exposição intrauterina ao *S. neurona*, mesmo com a proximidade filogenética a outros protozoários em que a infecção transplacentária já foi confirmada, como *Neospora* spp. (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2006; PUSTERLA et al., 2011; ANTONELLO et al., 2012) e *T. gondii* (BUXTON & RODGER, 2008). No entanto, há indícios de que assim como outros protozoários apicomplexas, *S. neurona* possa também estabelecer infecção endógena. Como o relato de um potro, filho de mãe soropositiva para *S. neurona*, que aos dois dias de idade apresentava sinais sugestivos de MEP e aos dois meses o líquido cérebro-espinhal foi positivo no Western blot, o animal se recuperou após do tratamento indicado para MEP (GRAY et al., 2001). Uma vez que a soroconversão ocorre aproximadamente 30 dias após a infecção (CUTTLER et al., 2001) é altamente sugestivo de que esse potro tenha

sido infectado por *S. neurona* ainda na vida intrauterina. Outra evidência que corrobora a hipótese de transmissão vertical por este protozoário, é a ocorrência de equinos soropositivos em áreas em que não há a presença do hospedeiro definitivo de *S. neurona*, como relatado em equinos da França. Esses animais nasceram na França, nunca saíram do país e não tiveram contato com *Didelphis* spp. (PITEL et al., 2002).

Para detectar a ocorrência da transmissão vertical foram analisadas amostras séricas de potros neonatos antes da ingestão do colostro. O feto equino é capaz de formar uma resposta imune humoral em torno dos 180 dias de gestação (PERRYMAN et al., 1980). Se exposto ao protozoário após esse período, anticorpos estarão presentes no soro do neonato pré-colostral. Além disso, a placenta da égua não permite a transferência de imunoglobulinas para o feto devido sua conformação difusa epiteliocorial microcotiledonária (ABD-ELNAEIM et al., 2006). Desta forma, pode-se afirmar que a detecção de anticorpos em amostras de soro de neonatos sem ingestão de imunidade passiva pelo colostro representam a ocorrência de infecção intrauterina e o desenvolvimento de imunidade adaptativa pelos neonatos. Assim sendo, neste estudo foram detectados sete potros reagentes, filhos de 64 éguas também positivas, o que demonstra que a transmissão vertical ocorreu em 10,94% (7/64) das gestações de éguas comprovadamente portadoras.

Surpreendentemente, foram detectados anticorpos em três potros filhos de éguas soronegativas (título inferior a 50), possivelmente devido a flutuação nos níveis de IgG durante a gestação, já demonstrado pela infecção por *N. caninum* (KORMANN et al., 2008). Provavelmente, no momento da coleta desses animais, a égua não apresentava níveis de IgG suficientes para o limiar de detecção da técnica utilizada (IFI). Deve-se salientar ainda que as amostras de soro das éguas foram obtidas somente no momento do parto, sem considerar o período total de gestação, não tendo registros de perdas prematuras ou problemas ocorridos

durante a gestação devido a infecção por *S. neurona*. Não foi observada diferença entre os nascimentos de potros soropositivos em relação ao título de anticorpos da égua, como a maioria dos animais adultos apresentou um título baixo, variando de 50 a 200, pode-se relacionar o maior número de nascimentos de potros soropositivos nas éguas com títulos mais baixos (tabela 2).

Devido a MEP ser de difícil diagnóstico e à existência de um tratamento eficaz (MACKAY, 2006), é importante o conhecimento dos animais expostos ao parasita, para que a MEP seja considerada nos diagnósticos diferenciais de doenças neurológicas e se faça o tratamento direcionado para a infecção. O custo do tratamento se torna bastante elevado devido ao seu período prolongado, tornando a prevenção e o controle os melhores métodos de se minimizar os prejuízos da doença.

Uma vez que este trabalho demonstrou a ocorrência de infecção transplacentária por *S. neurona* em equinos, novos estudos precisam ser desenvolvidos com o intuito de determinar a frequência em que ocorre e qual o impacto desta via de transmissão na epidemiologia da infecção em equinos e quais os prejuízos da infecção intrauterina para o embrião ou feto ou para o animal na vida adulta.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao BioRep e ao Setor de Virologia pela disponibilidade dos equipamentos e aos médicos veterinários Paulo N.L. Bergamo, Friedrich Frey Jr. e Sabine Kasinger pela cooperação. Agradecemos também aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro dos materiais e equipamentos necessários.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELNAEIM, M. M., et al. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta**, v. 27, n. 11-12, p. 1103-1113, 2006.

ANTONELLO, A. M., et al. The importance of vertical transmission of *Neospora sp.* in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 367-370, 2012.

BUXTON, D. e RODGER, S. M. Toxoplasmosis and neosporosis. In: Wiley-BLACKWELL, HOBOKEN, **Diseases of sheep**. 4 ed., Aitken, p. 112-118, 2008.

CUTLER, T. J., et al. Immunoconversion against *Sarcocystis neurona* in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 197-210, 2001.

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

DUBEY, J. P., et al. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 59-62, 1999.

DUBEY, J.P. Prevalence of *Sarcocystis* species sporocysts in wild caught opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v.86, p.705-710, 2000.

DUBEY, J. P., et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 295-304, 2001a.

DUBEY, J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v.95, n.2-4, p.89-131, 2001b.

ELSHEIKHA, H. M. Has *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Sporozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae) cospeciatiated with its intermediate hosts? **Veterinary Parasitology**, v.163, n.4, p.307-14, 2009.

FENGER, C. K., et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916-919, 1995.

FENGER, C. K. et al. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis sp.* sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v.68, n.3, p.199-213, 1997.

GRAY, L. C., et al. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. **Veterinary Record**, v. 149, n. 9, p. 269-273, 2001.

HOANE, J.S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

JOHNSON, A.L. et al. Utility of 2 Immunological Tests for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in Naturally Occurring Cases, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, p.1184–1189, 2010.

KORMANN, D. C. et al. Seroprevalence and month dynamic of *Neospora sp.* antibodies in pregnant mares. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. supl.1, p. 335-338, 2008.

KUBO, M. et al. Meningoencephalitis associated with *Sarcocystis spp.* in a free-living Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). **Journal of Comparative Pathology**, v.143, n.2-3, p.185-9, 2010.

LAM, K.K.H. et al. First report of equine protozoal myeloencephalitis in Hong Kong, **Equine Veterinary Education**, v.11, p.54-56, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil, **Veterinary Parasitology**, v.135, n.3-4, p. 215-221, 2006.

MACKAY, R.J. et al. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.16, n.3, p. 405-425, 2000.

MACKAY, J. R., Equine Protozoal Myeloencephalitis: Treatment, Prognosis, and Prevention, **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, n. 1, p.9-16, 2006.

MAYHEW, I. G. e GREINER, E. C. Protozoal diseases, **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.2, p.439-459, 1986.

MAYHEW, I. G. The equine spinal cord in health and disease II: The disease spinal cord. **Proceedings of the American Association of Equine Practice**, v.45, p.67-84, 1999.

PERRYMAN, L.E. et al. Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p. 1197–1200, 1980.

PITEL, P. H., et al. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 481-485, 2002.

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

REJMANEK, D. et al. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in opossums (*Didelphis virginiana*) from central California. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.1-2, p.8-14, 2009.

RONEN, N. Putative equine protozoal myeloencephalitis in an imported Arabian filly. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.63, p.78-79, 1992.

SAVILLE, W.J.A. et al. Evaluation of risk factors associated with clinical improvement and survival of horses with equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.1181-1185, 2000.

SOFALY, C.D., et al. Experimental induction of equine protozoan myeloencephalitis (EPM) in the horse: effect of *Sarcocystis neurona* sporocyst inoculation dose on the development of clinical neurologic disease. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.1164-1170, 2002.

VARDELEON, D., et al. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 273-282, 2001.

Tabela 1: Detecção de imunoglobulinas anti-*S. neurona* em amostras séricas de éguas e de potros por imunofluorescência indireta (IFI).

POTROS	ÉGUAS		TOTAL
	Positivas (%)	Negativas (%)	
Positivos (%)	7	3	10 (5,13) ^b
Negativos (%)	57	128	185
Total	64 (32,82) ^a	131	195

As letras a e b denotam diferença significativa ($\chi^2=6,608$; IC=95%; P=0,0155) nas frequências de anticorpos entre éguas na parição e amostras pré-colostrais de potros. O valor de P foi calculado pelo Teste Exato de Fisher.

Tabela 2: Níveis de IgG contra *S. neurona* das amostras das éguas testadas por IFI e a frequência de potros soropositivos nascidos de acordo com o título das éguas.

Título da Égua	Número de Éguas (%)	Partos Soropositivos (%)
50	20	4 (20,00% - 4/20)
100	21	2 (9,52% - 2/21)
200	16	1 (6,25% - 1/16)
400	5	0
800	2	0
Total	195	7 (11%)

Usando o teste χ^2 para comparação da frequência de transmissão vertical de acordo com o título da égua não foi observada diferença significativa entre o nível de anticorpos maternos e a transmissão transplacentária.

3. CAPÍTULO II

**INVESTIGAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Sarcocystis Neurona* E
Sarcocystis Cruzi EM EQUINOS
ANTIBODIES AGAINST *Sarcocystis neurona* AND *Sarcocystis cruzi* INVESTIGATION IN
HORSES**

Ana Maria Antonello^{1*}, Felipe Lamberti Pivoto¹, Giovana Camillo¹, Patricia Braunig¹, Luis Antonio Sangioni¹, Endrigo Pompermayer^{II}, Luís Fernando Pita Gondim^{III}, Maria Cecília Venturini^{IV}, Fernanda Silveira Flores Vogel¹

(Artigo submetido na revista científica Ciência Rural, 2013)

RESUMO

Sarcocystis neurona é o principal agente da Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP), importante doença neurológica caracterizada por alterações comportamentais ou musculares, que prejudica o desempenho e a criação dos animais, enquanto *Sarcocystis cruzi* é um patógeno relacionado a miosites em bovinos. Embora sejam parasitas correlatos, o ciclo de vida das duas espécies de protozoário é distinto, *S. neurona* tem gambás (*Didelphis sp.*) e *S. cruzi*, cães como hospedeiros definitivos. Contudo, *S. neurona* e *S. cruzi* podem ocorrer concomitantemente em um

^I Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS , Brasil. 97105-900. Telefone (55)3220 8071. E-mail: ana_antonello@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^{II} Equine Hospital, Qatar Racing & Equestrian Club, Doha, Qatar.

^{III} Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

^{IV} Laboratorio de Inmunopatologia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

plantel de equinos, uma vez que há relatos de cistos de *S. cruzi* no sistema nervoso central de equinos. No presente estudo foi realizada a sorologia, pela técnica de imunofluorescência indireta, de 189 éguas frente a antígenos de *S. neurona* e *S. cruzi* com o objetivo de avaliar o grau de exposição dos animais a esses parasitas. Na análise dos resultados foi observado que a maioria dos animais (84,13%) reagiu a pelo menos uma das espécies, sendo que o número de animais que apresentou anticorpos contra *S. cruzi* foi maior que *S. neurona* (80,42% e 33,86% respectivamente) e um terço dos animais soropositivos reagiu a antígenos das duas espécies.

Palavras-chave: sorologia, soroprevalência, mieloencefalite equina por protozoário, apicomplexa.

ABSTRACT

Sarcocystis neurona is the primary agent for Equine Protozoan Mieloencefalite (EPM), important neurological disease that impairs animal performance and husbandry, while *Sarcocystis cruzi* is a pathogen related to myositis in cattle. The parasites life cycle is distinct, *S. neurona* has opossums (*Didelphis sp.*) and *S. cruzi*, dogs as definitive hosts, however was already reported the presence of *S. cruzi* in horses central nervous system and these species can occur concomitant in herd. In the present study the serology was performed, by indirect fluorescent antibody test, of 189 mares front antigens of *S. neurona* and *S. cruzi* in order to assess the degree of animals exposure to these parasites. Analyzing results we observed that most of the animals (84.13%) reacted with at least one protozoal specie and the number of animals which showed antibodies against *S. cruzi* was greater than *S. neurona* (80.42% and 33.86% respectively) and a third of seropositive animals reacted to antigens of both species.

Keywords: serology, seroprevalence, mieloencefalite equine protozoal, Apicomplexa.

INTRODUÇÃO

Equinos podem ser hospedeiros intermediários de varias espécies do gênero *Sarcocystis* como *Sarcocystis fayeri*, *Sarcocystis equicanis*, *Sarcocystis bertrami* e ainda *Sarcocystis cruzi*, que completam seu ciclo em cães (DUBEY e LINDSEY, 2006) além de *Sarcocystis neurona*, cujo hospedeiro definitivo é *Didelphis sp.* (DUBEY et al, 2001b; REJMANEK et al., 2009). *S. neurona* é descrito como principal agente causador da mieloencefalite equina por protozoário (MEP) (MACKAY et al., 2000), uma enfermidade infecciosa de caráter neurológico e muitas vezes fatal (MAYHEW, 1999).

A principal ferramenta para o diagnóstico ante-morte da MEP é a sorologia (JOHNSON et al, 2010), porem este é um método indireto de detecção da exposição ao parasita, o que não significa que haja a infecção ativa pelo protozoário no animal soropositivo. Estima-se que nos Estados Unidos aproximadamente metade dos equinos sejam soropositivos para *S. neurona* (MACKAY, 1997), já no Brasil os registros da exposição de equinos ao agente são mais escassos. Contudo, HOANE et al. (2006) encontraram 69,6% de soropositividade para *S. neurona* em equinos de diferentes regiões do território brasileiro, demonstrando alto grau de exposição dos animais a antígenos de *S. neurona*. Embora a alta prevalência descrita na literatura, os casos de doença clínica não são comuns. Porem o manejo intensivo e a imunossupressão decorrente do estresse (após cirurgias, peri-parto ou o uso de corticoides) são descritos como fatores agravantes na evolução clínica da doença (COOLEY et al., 2007).

Sarcocystis cruzi, por sua vez, é uma espécie que ocorre comumente em bovinos, podendo causar lesões musculares e baixo ganho de peso (MORÉ et al, 2010). Os índices de reatividade sorológica para *S. cruzi* podem beirar os 100% em rebanhos bovinos (MORÉ et al., 2011), no entanto, pouco se conhece acerca de prevalência e importância clínica deste protozoário na

espécie equina, embora o mesmo seja capaz de formar seus sarcocistos nos tecido de equinos (HAMIR et al., 1993).

O ciclo biológico de *S. neurona* e *S. cruzi* é similar, embora envolva diferentes espécies de hospedeiros definitivos, os quais consistem em gambás do gênero *Didelphis sp.* e cães, respectivamente (FENGER et al., 1995; DUBEY et al, 2001b; REJMANEK et al., 2009; XIANG et al., 2011). Os hospedeiros intermediários se infectam pela ingestão de esporocistos presentes no ambiente. Após estabelecida a infecção, *S. neurona* tende a formar sarcocistos no tecido nervoso ou no tecido muscular dos equinos (MULLANEY et al., 2005), enquanto que *S. cruzi* tende a formar sarcocistos no tecido muscular de bovinos (MORÉ et al., 2011). A infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de tecidos infectados, com consequente liberação de esporocistos nas fezes, contaminando o ambiente (FENGER et al., 1995; DUBEY et al., 2001a; XIANG et al., 2011).

A sorologia é a principal ferramenta no diagnóstico *ante-mortem* da MEP, uma vez que a detecção direta do parasita é muito difícil antes da necropsia, e a partir do *status* sorológico combinado à avaliação clínica são tomadas as medidas terapêuticas. No entanto, há pelo menos dois fatores que complicam esta avaliação: a presença de anticorpos contra *Sarcocystis sp.* indica que houve exposição ao agente, mas não necessariamente persistência da infecção ativa; além disso, pode haver reatividade sorológica cruzada entre espécies deste gênero deste protozoário. Deve-se considerar que *S. neurona* e *S. cruzi* são capazes de infectar e estimular uma resposta imune em equinos, e tem condições de manter seus ciclos de forma concomitante dentro do plantel. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar o status sorológico de éguas quanto à presença de anticorpos contra antígenos de *S. neurona* e *S. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais testados

Foram testadas amostras de soro de 189 éguas Puro Sangue Inglês (PSI) de dois haras localizados no Rio Grande do Sul, sul do Brasil. As propriedades são localizadas na região Sudoeste do Estado, onde há registros da presença do gambá (*Didelphis sp.*), hospedeiro definitivo de *S. neurona*, além da presença de cães nas propriedades. Os animais eram monitorados rotineiramente por médico veterinário e todas as coletas foram realizadas no momento do parto. O sangue total foi centrifugado a 250g por 10 minutos para a obtenção do soro sanguíneo, este foi então estocado a -20°C até o momento do teste.

Produção de antígenos

A pesquisa de imunoglobulinas G (IgG) anti-*S. neurona* foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Para tal, foi usado como antígeno merozoítos de *S. neurona* da cepa SN-37R (SOFALY et al., 2002) cultivados em células da linhagem CV-1, com meio RPMI, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, piruvato, penicilina, estreptomicina e anfotericina. No preparo das lâminas de IFI, a monocamada celular infectada foi recuperada dos frascos de cultivo, centrifugada a 1500g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o *pellet*, ressuspensão em solução salina fosfatada (PBS) seguida de nova centrifugação (1500 x g por 10 min.). O *pellet* foi novamente ressuspensionado em PBS e dispensado em lâminas de *teflon*. Após a secagem das lâminas à temperatura ambiente, as mesmas foram embebidas em solução de metanol 100% para a fixação do antígeno e estocadas a -20°C até o momento do uso.

Os testes para *Sarcocystis cruzi* foram realizados no laboratório da Universidade Nacional de La Plata, Argentina. Para a preparação das lâminas foram utilizados bradizoítos colhidos de coração bovino infectado conforme recomendações de MORÉ et al. (2008).

Reação de imunofluorescência indireta (IFI)

A diluição do soro sanguíneo em PBS utilizada para a triagem pela RIFI, tanto para *S. neurona* como para *S. cruzi*, foi de 1:50 (MOREÉ et al, 2008). Anticorpo anti-IgG equina conjugado a fluoresceína foi usado como anticorpo secundário na reação. Uma amostra de soro sabidamente positiva e outra negativa quanto à presença de anticorpos anti-*S. neurona* (nas lâminas de *S. neurona*) e anti-*S. cruzi* (nas lâminas de *S. cruzi*) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Eram consideradas positivas, as amostras em que houvesse fluorescência em toda a superfície dos merozoítos/bradizoítos de *Sarcocystis spp.* e negativas, as amostras em que a fluorescência era apical ou ausente (DUARTE et al., 2003).

Análise estatística

As amostras positivas e negativas para cada uma das espécies de *Sarcocystis spp.* foram comparadas para o cálculo das frequências de anticorpos contra cada uma das espécies do protozoário nas éguas testadas. A análise comparativa das frequências observadas foi realizada pelo teste de χ^2 , utilizando o software GraphPad Prism 5®.

Comitê de ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, cujo processo está registrado sob número 81/2009.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo o conhecimento de que equinos podem servir de hospedeiros intermediários de diversas espécies do gênero *Sarcocystis* (DUBEY et al, 2001b; HAMIR et al., 1993; DUBEY e LINDSEY, 2006; REJMANEK et al., 2009), neste estudo utilizou-se o teste de IFI com merozoítos de *S. neurona* e bradizoítos *S. cruzi* para investigar a exposição de equinos na região Sul do Brasil. Conforme os resultados deste estudo, descritos na tabela 1, pode-se observar que uma grande proporção (84,13%) das éguas testadas teve contato com pelo menos uma das espécies de *Sarcocystis spp.* (*S. neurona* ou *S. cruzi*). As éguas testadas são criadas em haras do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, demonstrando-se a circulação de *Sarcocystis spp.* nesta região.

Em um estudo retrospectivo utilizando a técnica de imunoistoquímica em tecidos de equinos diagnosticados com MEP, HAMIR et al (1993) observaram a presença de sarcocistos de *S. neurona* e *S. cruzi*, no sistema nervoso dos animais, o que sugere o potencial de ambas as espécies do protozoário como agente etiológico da MEP. De forma interessante, no mesmo estudo os autores também encontraram uma proporção maior de animais reagindo a *S. cruzi* (67%) que *S. neurona* (51%) na imunoistoquímica.

Na comparação sorológica de equinos frente a antígenos de *S. neurona* e *S. cruzi*, foi observado frequência de detecção de anticorpos de 33,86% (64/189) e 80,42% (152/189), respectivamente, apresentando diferença significativa entre as duas espécies ($\chi^2=4,587$, 1; IC=95%; p=0,0322) (tabela 1). Dos 189 animais testados, 159 (84,13%) reagiram a pelo menos um dos protozoários. Destes, 102 apresentavam anticorpos somente contra um dos agentes - 95 contra *S. cruzi* e sete contra *S. neurona*. Aproximadamente um terço das éguas soropositivas apresentava anticorpos contra antígenos das duas espécies de protozoário (57/159) (tabela1) indicando exposição à ambas as espécies de *Sarcocystis spp.* pesquisadas. Não houve detecção de anticorpos contra *Sarcocystis spp.* em 30 (15,87%) das éguas testadas. É importante ressaltar que

estes mesmos animais quando testados para *Neospora caninum* pela mesma técnica, apresentaram 64,5% de animais sororreativos (ANTONELLO et al., 2012), o que sugere pouca probabilidade de ocorrência de reação cruzada entre os dois gêneros.

A presença de *S. cruzi* é mais comum no tecido muscular que no tecido nervoso de bovinos, acarretando perdas de produtividade no rebanho (MOREÉ et al. 2010). O sistema de criação de bovinos disseminado no Sul do Brasil, aliado ao estreito contato com cães (hospedeiros definitivos), que permite a eficiente passagem de parasitas de canídeos para bovinos e vice-versa são alguns dos motivos implicados nas altas prevalências de bovinos infectados na região (MOREÉ et al., 2011). Dessa forma, pode-se acreditar que o mesmo padrão de contato com o parasita ocorra para a espécie equina nesta região, acarretando em maior soroprevalência de *S. cruzi* do que de *S. neurona*. Nesse sentido, deve-se levar em conta que os cães permanecem nos mesmos ambientes dos equinos nos haras pesquisados, podendo-se sugerir que seja mais comum o contato de equinos com cães da propriedade do que com animais selvagens, como gambás (*Didelphis sp.*), hospedeiros definitivos do *S. neurona*. Assim, teoricamente, os equinos teriam maior probabilidade de infecção pela ingestão de esporocistos de *S. cruzi* na água ou alimento do que de esporocistos de *S. neurona*.

A sorologia é a principal ferramenta no diagnóstico *ante-mortem* da MEP, e a partir desse resultado são tomadas as decisões terapêuticas e/ou preventivas, por isso é importante ter em mente que um resultado positivo não indica necessariamente infecção ativa por *S. neurona* e manifestação clínica. Protozoários de diferentes espécies dentro do gênero *Sarcocystis* podem expressar as mesmas proteínas em sua superfície (ROSSANO et al., 2000; SAVILLE et al, 2004), e os anticorpos produzidos contra essas proteínas vão reagir às mesmas proteínas presentes em outra espécie de *Sarcocystis*, configurando o que se conhece por reação cruzada. Dessa forma é de grande importância considerar além do resultado positivo da sorologia, a presença de sinais

clínicos, o histórico dos animais, a epidemiologia do protozoário – presença do hospedeiro definitivo (*Didelphis sp.*) - para dar início ao tratamento dos animais acometidos. Pois o tratamento é eficaz, porém é demorado e dispendioso para ser usado em todos animais que apresentarem sorologia positiva.

CONCLUSÕES

Foi comprovada, por meio de sorologia por IFI, a presença de antígenos de outra espécie de *Sarcocystis*, que não é comumente relacionada a infecções em equinos, no soro de animais do sul do Brasil. Tendo o conhecimento de que espécies do mesmo gênero podem incitar reação cruzada em testes sorológicos, por compartilharem antígenos semelhantes, salienta-se a importância de considerar a presença de sinais sugestivos de MEP para o diagnóstico clínico, para então iniciar o tratamento dos animais acometidos. Outros estudos são necessários no sentido de identificar quais outras espécies de *Sarcocystis* estão presentes no plantel ou na região, e qual a importância de *S. cruzi* no desempenho de equinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONELLO, A. M., et al. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3–4, p. 367-370, 2012.

COOLEY, A. J. et al. *Sarcocystis neurona* encephalitis in a dog. **Veterinary Pathology**, v.44, n.6, p.956-61, 2007.

DUARTE, P. C., et al. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 1, p. 8-13, 2003.

DUBEY, J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v.95, n.2-4, p.89-131, 2001a.

DUBEY, J. P., et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 295-304, 2001b.

DUBEY, J. P.e LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 645-671, 2006.

FENGER, C. K., et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916-919, 1995.

HAMIR, A. N., et al. Immunohistochemical study to demonstrate *Sarcocystis neurona* in equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 3, p. 418-422, 1993.

HOANE, J.S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

JOHNSON, A.L. et al. Utility of 2 Immunological Tests for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in Naturally Occurring Cases, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, p.1184–1189, 2010.

MACKAY, R.J. et al. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.16, n.3, p. 405-425, 2000.

MACKAY, R. J. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 79-96, 1997

MAYHEW, I. G. The equine spinal cord in health and disease II: The disease spinal cord. **Proceedings of the American Association of Equine Practice**, v.45, p.67-84, 1999.

MORÉ, G., et al. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. **Parasitology Research**, v. 102, n. 4, p. 671-675, 2008.

MORÉ, G., et al. Serologic profiles for *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* and productive performance in naturally infected beef calves. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 689-693, 2010.

MORÉ, G., et al. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 162-165, 2011.

MULLANEY, T., et al. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 27-36, 2005.

REJMANEK, D. et al. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in opossums (*Didelphis virginiana*) from central California. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.1-2, p.8-14, 2009.

ROSSANO, M. G., et al. Improvement of western blot test specificity for detecting equine serum antibodies to *Sarcocystis neurona*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p. 28-32, 2000.

SAVILLE, W. J., et al. Experimental infection of ponies with *Sarcocystis fayeri* and differentiation from *Sarcocystis neurona* infections in horses. **Journal Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1487-1491, 2004.

SOFALY, C.D. et al. Experimental induction of equine protozoan myeloencephalitis (EPM) in the horse: effect of *Sarcocystis neurona* sporocyst inoculation dose on the development of clinical neurologic disease. **The Journal of Parasitology** v.88, p.1164-1170, 2002.

XIANG, Z., et al. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 460-466, 2011.

Tabela 1: Imunoglobulinas anti-*S. neurona* e anti-*S. cruzi* em amostras séricas de éguas por imunofluorescência indireta (IFI).

<i>Sarcocystis neurona</i>	<i>Sarcocystis cruzi</i>		Total (%)
	Positivos	Negativos	
Positivos	57	7	64 (33,86) ^a
Negativos	95	30	125
Total (%)	152 (80,42) ^b	37	189

^a e ^b indicam que houve diferença significativa entre a frequência de anticorpos contra *S. neurona* e *S. cruzi* nos animais testados ($\chi^2 = 4,587$; IC=95%; P=0,0322).

4. CONCLUSÕES

Com a realização destes estudos pôde-se averiguar:

1. A ocorrência da transmissão vertical pela via transplacentária por *Sarcocystis neurona* em equinos, apesar de pouco frequente se mostrou uma via alternativa de manutenção do agente no plantel;
2. Frequência de anticorpos contra *S. neurona*.
3. O grau de exposição de equinos a *Sarcocystis cruzi*.

5. REFERÊNCIAS

ABD-ELNAEIM, M. M., et al. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta**, v. 27, n. 11-12, p. 1103-1113, 2006.

ANTONELLO, A. M., et al. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 367-370, 2012.

BUXTON, D. e RODGER, S. M. Toxoplasmosis and neosporosis. In: Wiley-BLACKWELL, HOBOKEN, **Diseases of sheep**. 4 ed., Aitken, p. 112-118, 2008.

COOK, A. G., et al. Interpretation of the detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in the serum of young horses. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 187-195, 2001.

COOLEY, A. J. et al. *Sarcocystis neurona* encephalitis in a dog. **Veterinary Pathology**, v.44, n.6, p.956-61, 2007.

CUTLER, T. J., et al. Immunoconversion against *Sarcocystis neurona* in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 197-210, 2001.

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

DUARTE, P. C., et al. Risk of postnatal exposure to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 8, p. 1047-1052, 2004.

DUBEY, J. P., et al. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 59-62, 1999.

DUBEY, J.P. Prevalence of *Sarcocystis* species sporocysts in wild caught opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v.86, p.705-710, 2000.

DUBEY, J. P., et al. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 295-304, 2001a

DUBEY, J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v.95, n.2-4, p.89-131, 2001b.

DUBEY, J. P. e LINDSAY, D. S. *Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis* in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 22, n. 3, p. 645-671, 2006.

ELSHEIKHA, H. M. Has *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Sporozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae) cospeciatiated with its intermediate hosts? **Veterinary Parasitology**, v.163, n.4, p.307-14, 2009.

FENGER, C. K., et al. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 916-919, 1995.

FENGER, C. K. et al. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis sp.* sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). **Veterinary Parasitology**, v.68, n.3, p.199-213, 1997.

GRAY, L. C., et al. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. **Veterinary Record**, v. 149, n. 9, p. 269-273, 2001.

HAMIR, A. N., et al. Immunohistochemical study to demonstrate *Sarcocystis neurona* in equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 3, p. 418-422, 1993.

HOANE, J. S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 9, p. 1050-1056, 2005.

HOANE, J.S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.155-159, 2006.

JOHNSON, A.L. et al. Utility of 2 Immunological Tests for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in Naturally Occurring Cases, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, p.1184–1189, 2010.

KUBO, M. et al. Meningoencephalitis associated with *Sarcocystis* spp. in a free-living Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). **Journal of Comparative Pathology**, v.143, n.2-3, p.185-9, 2010.

LAM, K.K.H. et al., First report of equine protozoal myeloencephalitis in Hong Kong, **Equine Veterinary Education**, v.11, p.54-56, 1999.

LINDSAY, D. S. e DUBEY, J. P. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 179-186, 2001.

LINS, L. A. et al. Mieloencefalite protozoária equina em equinos nativos do município de Bagé-RS, sul do Brasil, **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.103, n.567-568, p.177-180, 2008.

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil, **Veterinary Parasitology**, v.135, n.3-4, p. 215-221, 2006.

MACKAY, J. R., Equine Protozoal Myeloencephalitis: Treatment, Prognosis, and Prevention, **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, n. 1, p.9-16, 2006.

MAYHEW, I. G. e GREINER, E. C. Protozoal diseases, **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.2, p.439-459, 1986.

MORE, G., et al. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 51-54, 2009.

MORÉ, G., et al. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 162-165, 2011.

MORE, G., et al. Serologic profiles for *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* and productive performance in naturally infected beef calves. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 689-693, 2010.

PERRYMAN, L.E. et al. Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p. 1197–1200, 1980.

PITEL, P. H., et al. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 481-485, 2002.

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

REJMANEK, D. et al. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in opossums (*Didelphis virginiana*) from central California. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.1-2, p.8-14, 2009.

RONEN, N. Putative equine protozoal myeloencephalitis in an imported Arabian filly. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.63, p.78-79, 1992.

SAVILLE, W.J.A. et al. Evaluation of risk factors associated with clinical improvement and survival of horses with equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.1181-1185, 2000.

XIANG, Z., et al. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 460-466, 2011.