

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

**INFECÇÃO POR *Sarcocystis spp.* EM OVINOS E
EQUINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luiza Pires Portella

Santa Maria, RS, Brasil

2015

INFECÇÃO POR *Sarcocystis spp.* EM OVINOS E EQUINOS

Luiza Pires Portella

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, 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

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pires Portella, Luiza
INFECCÃO POR Sarcocystis spp. EM OVINOS E EQUINOS /
Luiza Pires Portella.-2015.
41 p.; 30cm

Orientadora: Fernanda Silveira Floes Vogel
Coorientador: Luis Antonio Sangioni
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. Sarcocystis 2. Ovinos 3. Equinos 4. PCR 5. Exame
direto I. Silveira Floes Vogel, Fernanda II. Sangioni,
Luis Antonio III. Título.

Todos os direitos autorais reservados a Luiza Pires Portella. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (55) 9662-3717 - e-mail: lupiresportella@gmail.com

**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

**INFECÇÃO POR *Sarcocystis* spp. EM OVINOS E
EQUINOS**

elaborada por
Luiza Pires Portella

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Anderson Barbosa de Moura (UDESC)

Marta Lizandra do Rêgo Leal (UFSM)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço à todos de coração.

Aos meus pais, Leonardo e Claudia meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!!

Ao meu irmão Rafael e minha cunhada Fabiane por todo o carinho e amizade. Obrigada pela força!

Ao Marcelo, por todo apoio, carinho, compreensão durante estes 7 anos, desde o início da graduação até hoje. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de me graduar nesta Universidade Federal e poder levar o nome que esta representa. Bem como ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, um programa de excelência ao qual tenho muito orgulho em fazer parte.

A professora e orientadora Fernanda Silveira Flores Vogel por ter acreditado e me apoiado de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposta a me ouvir e ajudar nas minhas ideias “mirabolantes” que foram surgindo durante o desenvolvimento dos meus projetos, sempre dizendo: “ Vai anotando pra não esquecer, que a gente faz..”, mas acima de tudo por ter sido em muitos momentos conselheira, confidente, mãe e amiga. Tu sabes que és minha referência profissional.

Ao professor Luis Antônio Sangioni por sempre estar disposto a ajudar, por todo o carinho e atenção que sempre dispôs.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias, por terem sempre me apoiado na elaboração deste projeto, me ajudando sempre que precisei, em especial ao Pós-graduando Gustavo Cadore por ter me ajudado tanto no final desta etapa e aos alunos de iniciação científica, que sem eles os meus trabalhos se tornariam inviáveis.

Por fim a todos os amigos que torceram e acompanham minhas angustias e minhas conquistas, saibam o quanto serei grata pela amizade de vocês!!!!

Muito obrigada!

RESUMO

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

INFECÇÃO POR *Sarcocystis* spp. EM OVINOS E EQUINOS

AUTOR: Luiza Pires Portella

ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2015.

As infecções causadas por protozoários da família Sarcocystidae têm distribuição mundial e são comuns em ruminantes, causando perdas econômicas importantes. Este estudo avaliou infecções de *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos da região sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletadas amostras de miocárdio de 80 ovelhas criadas em sistema extensivo. Cistos de tecido foram detectados por exame direto e a presença dos agentes também foi confirmada por PCR. A avaliação macroscópica não revelou alterações, mas o exame microscópico direto mostrou cistos em 76,2% (61/80) das amostras e todos os cistos eram morfológicamente semelhantes a *Sarcocystis tenella* ou *Sarcocystis arieticanis*. A PCR detectou DNA de *Sarcocystis* spp. em 21,2% (17/80) das amostras testadas e DNA de *T. gondii* em 15% (12/80). Em 6,2% (5/80) foram detectados DNA de ambas os protozoários. Todas as amostras de PCR positivas (23,7% - 19/80) também foram positivas pelo exame direto (cistos microscópicos). Assim, uma alta ocorrência de cistos teciduais microscópicos em ovinos da região do sudoeste do estado do Rio Grande do Sul foi detectada. Apesar de o PCR não ter mostrado boa sensibilidade para identificar os agentes causadores destes cistos, foi possível verificar a presença de *Sarcocystis* spp. e *T. gondii* em amostras do músculo cardíaco de ovinos. Isso pode ser um fator de risco para animais e contaminação humana, não só através do consumo, mas também através de manipulação das carcaças desses animais. A Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP) é uma enfermidade neurológica que acomete equinos e possui como principal agente o protozoário *Sarcocystis neurona*. Porém o papel dos equinos no ciclo deste protozoário não está completamente esclarecido. O objetivo deste trabalho foi elucidar o papel dos equinos como hospedeiros intermediários no ciclo do protozoário *S. neurona*, através da ocorrência de cistos nestes animais e determinar a frequência de detecção de anticorpos anti- *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *T. gondii* em equinos abatidos em frigorífico no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletadas 197 amostras de soro e coração de equinos. Das amostras pesquisadas, não houve detecção de cistos, ácidos nucleicos ou alterações histopatológicas relacionadas ao *Sarcocystis* spp. Relacionado com a detecção de anticorpos, 146 (74,1%) foram positivos para pelo menos um dos protozoários pesquisados. Anticorpos para *Sarcocystis* spp. foram encontrados em 36% (71/197), para *Neospora* spp. em 39,1% (77/197) e para *T. gondii* em 47,2% (93/197). Assim a não detecção de cistos teciduais, associado com a detecção de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp., reforça a participação dos equinos como hospedeiros acidentais no ciclo deste protozoário, minimizando a participação destes animais na epidemiologia da infecção por *Sarcocystis* spp.

Palavras-chave: *Sarcocystis* spp.. PCR. Diagnóstico. Ovinos. Equinos.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

INFECÇÃO POR *Sarcocystis* spp. EM OVINOS E EQUINOS

AUTHOR: Luiza Pires Portella

ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

Defense Place and Date: Santa Maria, February 24nd, 2015

Infections by protozoa of the Sarcocystidae family have worldwide distribution and are common in ruminants, causing important economic losses. This study evaluated *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Southwest region of Rio Grande do Sul, Brazil. Myocardium samples of 80 sheep raised on extensive system were collected. Tissue cysts were detected by direct examination and the presence of the agents was also confirmed by PCR. Macroscopic evaluation did not reveal changes, but direct microscopic examination showed cysts in 76.2% (61/80) of samples and all cysts were morphologically similar with *Sarcocystis tenella* or *Sarcocystis arieticanis*. PCR detected *Sarcocystis* spp. DNA in 21.2% (17/80) of samples tested and *T. gondii* DNA in 15% (12/80). In 6.2% (5/80) DNA of both protozoan were detected. Presence of *N. caninum* nucleic acids was not observed in the samples tested. All PCR-positive samples (23.7% - 19/80) were also positive by direct examination (microscopic cysts). Thus, a high occurrence of microscopic tissue cysts in sheep from the Southwest region of the state of Rio Grande do Sul was detected. Although PCR did not show a good sensitivity to identify the causative agents of these cysts, was possible to verify the presence of *Sarcocystis* spp. and *T. gondii* in cardiac muscle samples of the ovine. This may be a risk factor for animal and human contamination, not only through consumption, but also through handling the carcasses of these animals. Equine protozoal myeloencephalitis is a neurologic disease of horses, most often caused by the *Sarcocystis neurona*. However, the role of horses in the life cycle this parasite is not completely understood. This study attempts to elucidate the role of horses as intermediate hosts in *S. neurona* cycle, through occurrence of cysts in these animals and determine the antibodies frequency for *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. and *T. gondii* in slaughtered horses. Were collected 197 serum and heart samples of equines. None of the myocardium samples were detected tissue cysts, nucleic acids or histopathological changes associated to *Sarcocystis* spp. In antibodies detection, 146 (74.1%) serum samples were positive for studied protozoa. Antibodies against *Sarcocystis* spp. were detected in 36% (71/197), to *Neospora* spp. in 39.1% (77/197) and to *T. gondii* in 47,2% (93/197). Thus, the failure in detect tissue cysts, associated with antibodies anti-*Sarcocystis* spp. detection, increases the role of horses as accidental hosts in the cycle this protozoan, declining your participation in the epidemiology of *Sarcocystis* infection.

Key words: *Sarcocystis* spp.. PCR. Diagnostic. Ovines. Equines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protozoa DNA detection by PCR in myocardium samples from ovines. *Sarcocystis* spp. (700bp); *Toxoplasma gondii* (451bp) and *Neospora caninum* (328bp). Lane M: Molecular weight marker (100bp); lane 1: negative control; lanes 2, 3, 4, 5: myocardium samples; lane 6: positive control.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Target gene amplified by polymerase chain reaction (PCR), with primer sequences and base pair size (bp) of PCR amplification products of <i>Sarcocystis</i> spp., <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i>	23
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 CAPÍTULO 1 - Molecular detection of protozoa of the Sarcocystidae family in sheep from State of Rio Grande do Sul, Brazil	14
ABSTRACT.....	14
RESUMO.....	15
INTRODUCTION.....	16
MATERIALS AND METHODS.....	17
RESULTS.....	18
DISCUSSION.....	18
CONCLUSIONS.....	19
REFERENCES	20
3 CAPÍTULO 2 - Prevalência de anticorpos para <i>Sarcocystis</i> spp., <i>Neospora</i> spp. e <i>Toxoplasma gondii</i>, associado a ausência de cistos teciduais de <i>Sarcocystis neurona</i> em equinos	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

Protozoários apresentam relevada importância como agentes etiológicos, determinando diferentes enfermidades tanto em animais como em humanos. Dentre estas enfermidades, algumas são causadas por protozoários do filo Apicomplexa, como os da família Sarcocystidae que inclui os gêneros *Besnoitia*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Neospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* (CORLISS, 1994).

Os parasitas do gênero *Sarcocystis* são protozoários obrigatoriamente intracelulares que apresentam ciclo de vida consistindo nas seguintes fases: esquizogonia, gametogonia e esporogonia (TENTER, 1995). São heteroxenos obrigatórios, sendo assim são necessários tanto hospedeiros intermediários (herbívoro ou onívoro) como hospedeiros definitivos (carnívoros) para completarem seu ciclo (DUBEY, 1976; TENTER, 1995). O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir tecidos contendo cistos maduros. A partir destes cistos, os bradizoítos liberados penetram na mucosa do intestino delgado e se transformam em gametas masculino (microgametas) e feminino (macrogametas). Os microgametas liberados se movem ativamente para a periferia do macrogameta e após a fertilização, desenvolve-se uma parede em volta do zigoto, o que determina a formação do oocisto (SHEFFIELD & FAYER, 1980; BOTELHO & LOPES, 1984).

Os oocistos do gênero *Sarcocystis* esporulam na lâmina própria, com divisão do oocisto em dois esporocistos (FAYER, 1974). Quatro esporozoítas são formados em cada esporocisto. Os períodos pré-patente e patente variam, mas, para a maioria das espécies de *Sarcocystis*, os oocistos são primeiramente liberados nas fezes entre 7 e 14 dias após a ingestão do cisto (DUBEY, 1976). A infecção do hospedeiro intermediário ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com os oocistos esporulados (CAWTHORN et al., 1986). O destino dos esporozoítos, do momento de ingestão do esporocisto até o desenvolvimento inicial nas artérias dos linfonodos mesentéricos, não é conhecido, e, o número de gerações de merogonia e o tipo de célula hospedeira, na qual a merogonia ocorre, variam com cada espécie de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 1982, 1989; OBENDORF & MUNDAY, 1987). Os merozoítos liberados iniciam a formação do cisto que são encontrados na musculatura estriada esquelética e cardíaca, bem como no sistema nervoso central e em fibras de Purkinje no coração dos hospedeiros intermediários (POWELL et al., 1986; DUBEY et al., 1989).

Os equinos podem ser hospedeiros de diversas espécies de *Sarcocystis*, tais como *Sarcocystis fayeri*, *Sarcocystis equicanis* e *Sarcocystis bertrami* (LEVINE, 1986). A espécie de maior importância em equinos é *Sarcocystis neurona*, principal agente causador da Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP) (DUBEY et al., 2001a). A exposição dos equinos ao *S. neurona* varia principalmente conforme a região geográfica (SAVILLE et al., 1997; TILLOTSON et al., 1999) e a presença do hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 2001a). A infecção por *S. neurona* ocorrendo principalmente nas Américas, em países como Estados Unidos, Brasil e Argentina (DUBEY et al., 1999; DUBEY et al., 2001a; HOANE et al., 2006).

O *S. neurona* possui duas espécies de gambás do gênero *Didelphis* (DUBEY et al., 2001a, REJMANEK et al., 2009, STANEK et al., 2003) como hospedeiros definitivos e diferentes espécies animais como hospedeiros intermediários, incluindo o gato doméstico (ELSHEIKHA, 2009). No Brasil, o principal hospedeiro definitivo do *S. neurona* é o gambá *Didelphis albiventris* (DUBEY et al., 2001a). A habilidade do *S. neurona* de ampliar sua gama de hospedeiros é um dos maiores obstáculos para o controle do parasito (ELSHEIKHA, 2009). A presença de hospedeiros selvagens e gatos em criações de equinos é um fator de risco para desenvolvimento de MEP nestes animais (STANEK et al., 2003).

A MEP é uma enfermidade de difícil diagnóstico, e este deve ser baseado no histórico, sinais clínicos, localização anatômica das lesões, métodos de imunodiagnóstico, resposta a terapia, evolução do caso clínico e exclusão de outras doenças (MACKAY, 2000). O teste padrão para o diagnóstico *ante-mortem* para MEP é o *Western Blotting (immunoblotting)* (DUBEY et al., 2001b), porém este teste não é realizado rotineiramente no Brasil. Atualmente, a imunofluorescência indireta (RIFI) tem se mostrado eficiente para detecção de anticorpos anti-*S. neurona* no soro de equinos e outros mamíferos, bem como em amostras de liquor, auxiliando no diagnóstico imunológico para MEP. Trabalhos têm demonstrado que a RIFI pode apresentar sensibilidade e especificidade semelhantes quando comparada ao *immunoblotting* (DUARTE et al., 2003, JOHNSON et al., 2010).

Apesar da expressiva quantidade de animais soropositivos, apenas uma minoria destes equinos desenvolvem os sinais clínicos da doença (COHEN & MACKAY, 1997; MACKAY, 1997). A partir de relatos de casos da doença e de estudos epidemiológicos a infecção é caracterizada normalmente por acometer equinos de todas as idades, raças e sexo (MACKAY et al., 1992; SAVILLE, et al., 1997). No Brasil, Hoane et al. (2006) detectaram 69,6% de animais reagentes, porém outros estudos descrevem 35,5% na Argentina (DUBEY et al., 1999) e 27,4% em diferentes regiões dos Estados Unidos. No entanto, sabe-se que a

prevalência pode variar conforme a região e o grupo de animais avaliados (VARDELEON et al., 2001).

Em ovinos, as espécies de *Sarcocystis* que comumente estabelecem infecção são *S. tenella*, *S. arieticanis*, que possuem canídeos como hospedeiros definitivos e *S. gigantea* e *S. medusiformis* que apresentam felídeos como hospedeiros definitivos (DUBEY & LINDSAY, 2006; ADRIANA et al., 2008). Dentre estas espécies, *S. tenella* e *S. arieticanis* produzem cistos microscópicos nos tecidos musculares e cardíacos dos ovinos e a patogenia é caracterizada por uma doença aguda com sinais clínicos como aborto, febre, anorexia (TENTER, 1995; PESCADOR et al., 2007). Por outro lado, as espécies *S. gigantea* e *S. medusiformis* são caracterizadas pela formação de cistos macroscópicos e não são consideradas patogênicas para os ovinos. Porém, causam maiores perdas econômicas pela alteração na qualidade da carne. Os ovinos podem apresentar infecções mistas apresentando, simultaneamente, as quatro espécies diferentes (TENTER, 1995; DUBEY & LINDSAY, 2006).

No Brasil, existem poucos relatos sobre a infecção em ovinos por *Sarcocystis*. Em trabalhos realizados em outros países, demonstram alta infecção que varia de 70 a 100%, indicando alta infecção deste protozoário nesta espécie (BORJI et al., 2012; HAMIDINEJAT et al., 2012; NOUROLLAHI FARD et al., 2009) e assim a necessidade de mais estudos sobre a infecção em ovinos no Brasil.

Tendo em vista a importância da infecção pelo *Sarcocystis* spp. em animais domésticos e principalmente as lacunas ainda presentes no que diz respeito a epidemiologia desta infecção, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de: i) determinar a ocorrência de cistos e de ácidos nucléicos de protozoários do gênero *Sarcocystis* spp. em ovinos; ii) investigar a presença de cistos e ácidos nucleicos de *S. neurona* em equinos; iii) detectar a presença de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. em soro de equinos obtidos em abatedouro. Esta dissertação está dividida em dois capítulos. Sendo o primeiro capítulo intitulado: “Molecular detection of protozoa of the Sarcocystidae family in sheep from State of Rio Grande do Sul, Brazil” e o segundo: “Prevalência de anticorpos para *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii*, associado a ausência de cistos teciduais de *Sarcocystis neurona* em equinos”.

2 CAPÍTULO 1

(Artigo submetido à revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”)

Molecular detection of protozoa of the Sarcocystidae family in sheep from State of Rio Grande do Sul, Brazil¹

Luiza P. Portella², Gustavo C. Cadore², Luís A. Sangioni², Marta E.M. Alves², Raiza Chemeris², Larissa P. Brum³ and Fernanda S.F. Vogel^{2*}

ABSTRACT - Portella L.P., Cadore G.C., Sangioni L.A., Alves M.E.M., Chemeris R., Brum L.P. & Vogel F.S.F. 2014. **Molecular detection of protozoa of the Sarcocystidae family in sheep from State of Rio Grande do Sul, Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: fefevogel@gmail.com

Infections by protozoa of the Sarcocystidae family have worldwide distribution and are common in ruminants, causing important economic losses. This study evaluated *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Southwest region of Rio Grande do Sul, Brazil. Myocardium samples of 80 sheep raised on extensive system were collected. Tissue cysts were detected by direct examination and the presence of the agents was also confirmed by PCR. Macroscopic evaluation did not reveal changes, but direct microscopic examination showed cysts in 76.2% (61/80) of samples and all cysts were morphologically similar with *Sarcocystis tenella* or *Sarcocystis arieticanis*.

¹ Received on November 17, 2014.

Accepted for publication on

² Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Corresponding author: fefevogel@gmail.com

³ Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal, Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 96450-000 - Dom Pedrito, RS - Brazil.

PCR detected *Sarcocystis* spp. DNA in 21.2% (17/80) of samples tested and *T. gondii* DNA in 15% (12/80). In 6.2% (5/80) DNA of both protozoan were detected. Presence of *N. caninum* nucleic acids was not observed in the samples tested. All PCR-positive samples (23.7% - 19/80) were also positive by direct examination (microscopic cysts). Thus, a high occurrence of microscopic tissue cysts in sheep from the Southwest region of the state of Rio Grande do Sul was detected. Although PCR did not show a good sensitivity to identify the causative agents of these cysts, was possible to verify the presence of *Sarcocystis* spp. and *T. gondii* in cardiac muscle samples of the ovine. This may be a risk factor for animal and human contamination, not only through consumption, but also through handling the carcasses of these animals.

INDEX TERMS: *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, PCR, diagnosis.

RESUMO - [Detecção molecular de protozoários da família Sarcocystidae em ovinos no Rio Grande do Sul.] As infecções causadas por protozoários da família Sarcocystidae têm distribuição mundial e são comuns em ruminantes, causando perdas econômicas importantes. Este estudo avaliou infecções de *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ovinos da região sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletadas amostras de miocárdio de 80 ovelhas criadas em sistema extensivo. Cistos de tecido foram detectados por exame direto e a presença dos agentes também foi confirmada por PCR. A avaliação macroscópica não revelou alterações, mas o exame microscópico direto mostrou cistos em 76,2% (61/80) das amostras e todos os cistos eram morfológicamente semelhantes a *Sarcocystis tenella* ou *Sarcocystis arieticanis*. A PCR detectou DNA de *Sarcocystis* spp. em 21,2% (17/80) das amostras testadas e DNA de *T. gondii* em 15% (12/80). Em 6,2% (5/80) foram detectados DNA de ambas os protozoários. Todas as amostras de PCR positivas (23,7% - 19/80) também foram positivas pelo exame direto (cistos microscópicos). Assim, uma alta ocorrência de cistos teciduais microscópicos em ovinos da região do sudoeste do estado do Rio Grande do Sul foi detectada. Apesar de o PCR não ter mostrado boa sensibilidade para identificar os agentes causadores destes cistos, foi possível verificar a presença de *Sarcocystis* spp. e *T. gondii* em amostras do músculo cardíaco de ovinos. Isso pode ser um fator de risco para animais e contaminação humana, não só através do consumo, mas também através de manipulação das carcaças desses animais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, PCR, diagnóstico.

INTRODUCTION

Protozoa classified in the family Sarcocystidae of the phylum Apicomplexa are parasites characterized by presented a sexual phase of development in the intestine of definitive hosts with oocysts liberation, and a lifecycle stage of tissue cyst in intermediate hosts (Tenter & Johnson 1997). Protozoa of the genera *Toxoplasma*, *Sarcocystis* and *Neospora* are important pathogens that cause abortions and significant economic losses in production animals (Tender 1995, Dubey 2003). Parasites belonging to these families have worldwide distribution and, depending on the genus, they can cause zoonotic infectious disease which is also considered an important public health problem (Dubey et al. 2007, Dubey 2009).

Ovine can be intermediate hosts for four *Sarcocystis* species (*S. gigantea*, *S. medusiformis*, *S. tenella* and *S. arieticanis*) and according to species, they can form macroscopic or microscopic cysts in different tissues of those animals (Dubey et al. 1989). These animals can be infected by ingesting sporocysts or sporulated oocysts present in food or water (Dubey & Lindsay 2006). In sheep, the main clinical signs of *Sarcocystis* infection are anorexia, weight loss and hyperthermia. However, depending on the number of sporocysts ingested, nervous signs, premature birth and abortion can be observed (Banerjee 1998, Heckerroth & Tenter 2007).

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two genera of protozoa biologically similar, responsible for causing abortion and reproductive problems in ruminants (Dubey et al. 2007, Dubey 2009). Toxoplasmosis is considered a zoonotic disease that can affect many species of animals, but felines are yours definitive hosts (Dubey 2009). Canids are definitive hosts of the *N. caninum* and this agent is considered a major cause of abortion in cattle (Gondim 2006, Dubey et al. 2007). It is possible find a large number of tissue cysts in *T. gondii* seropositive sheep (Dubey and Jones 2008). Hence, the objective of the present study was to evaluate *Sarcocystis* spp., *T. gondii* and *N. caninum* infections in sheep from the Southwest region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Myocardium samples (15g) of 80 healthy sheep, aging 8 to 36 months, of both genders, raised on extensive system, from the Southwest region of the state of Rio Grande do Sul, slaughtered under Federal Inspection Service were collected. These samples were stored in plastic bags, under refrigeration at 4°C until processing. To detect tissue cysts, direct examination was conducted as described by Dubey et al. (1989).

Total DNA was extracted from approximately 50mg of each tissue sample of cardiac muscle using a commercial kit (Wizard genomic DNA purification kit, Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions, with modifications in the lysis step, according to MORÉ et al. (2010). Following extraction, DNA concentration in each sample was estimated by measuring the ultraviolet light (UV) absorbance at 260nm, while the total DNA was stored at -20°C until use. Total DNA was subjected to polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for each one of the tested agents (Table 1). Each reaction was performed in a total volume of 25µL, containing 5X PCR buffer; 10mM dNTPs; 100ng of each primer; 2.5 units of Taq polymerase and 100ng of total DNA used as template. The PCR products were visualized by UV illumination after electrophoresis on a 1% agarose gel stained with GelRed® (Biotium Inc., CA, USA).

Sarcocystis spp. PCR was performed under the following conditions: initial denaturation for 4 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 40 sec at 94°C, annealing for 30 sec at 59°C and extension for 60 sec at 72°C; with a final extension for 6 min at 72°C. For *T. gondii* PCR: initial denaturation for 2 min at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation for 60 sec at 94°C, annealing for 60 sec at 65°C and extension for 60 sec at 72°C; with a final extension for 10 min at 72°C. For *N. caninum* PCR: initial denaturation for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 60 sec at 95°C, annealing for 60 sec at 60°C and extension for 60 sec at 72°C; with a final extension for 2 min at 72°C. Total DNA extracted from a sample of sheep cardiac muscle infected with *Sarcocystis* spp. was used as positive control. For *T. gondii* and *N. caninum*, DNA obtained from RH and NC-1 strains tachyzoites were respectively used.

RESULTS

Ovine heart did not show macroscopic visible changes, but in direct microscopic test was detected cysts in 76.2% (61/80) of the samples. All cysts visualized by direct examination had morphology consistent with *S. tenella* or *S. arieticanis*, ranging in size between 400 - 900µm and walls between 0.5-3µm (Heckerroth & Tenter 1999). PCR results showed that in 21.2% (17/80) and 15% (12/80) of the tested samples, *Sarcocystis* spp. and *T. gondii* DNA were respectively detected. In 6.2% (5/80) of the samples, DNA from both protozoa were detected (Fig. 1). We did not detect *N. caninum* nucleic acids in the samples from animals tested. All PCR-positive samples (23.7% - 19/80) were also positive by direct examination (detection of microscopic cysts).

DISCUSSION

Studies have shown that rate of infection in ovines with tissue cysts of *Sarcocystis* spp. is usually high, reaching almost 100% of the examined sheep (Thornton 1972, Ginawi & Shommein 1977, Latif et al. 1999). The occurrence of microscopic cysts in cardiac muscle of various animal species, infected with *Sarcocystis* spp., is more frequent than a possible presence of macroscopic cysts in the same tissue (Latif et al. 1999). There are four *Sarcocystis* species that can be found in sheep, two of them transmitted by felines and which form microscopic cysts (*S. tenella* and *S. arieticanis*) and the two others transmitted by canids (*S. gigantea* and *S. medusiformis*), can form macroscopic cysts (Dubey & Lindsay 2006, Adriana et al. 2008).

Molecular diagnostic techniques are being increasingly used to assist in determining the specific causative agents of tissue cysts (Yang & Zuo 2000, Moré et al. 2008, Hamidinejat et al. 2014). PCR is highly specific, but in some cases, it is difficult to perform the DNA extraction as well as to concentrate samples, thus may limiting the technique sensitivity (Alfonso et al. 2009). Another factor to be considered is that cysts are randomly distributed in host tissues, and their concentration may be lowered depending on the volume or the number of samples to be extracted (Piergili Fioretti 2004). In the present study, PCR assay showed a low sensitivity as compared to direct examination (23.7% versus 76.2%, respectively). This may be due that the sample volume used for nucleic acids extraction (50mg) was insufficient to detect parasitic DNA, as the concentration of tissue cysts is random or because PCR assay

presents a reduced ability to detect positive samples. PCR sensitivity can be improved by using the *nested*-PCR technique (Xiang et al. 2009), or the real-time PCR technique, which can also be used to detect different types of parasitic infections (Bell & Ranford-Cartwright 2002).

In the present study, *T. gondii* DNA was found in 15% of myocardium samples. The importance this finding must be investigated because, although the protozoan was not isolated from tissues, your DNA was detected. This is important as the infection through consumption of raw or undercooked tissues may spread *T. gondii* (Lunden & Uggla 1995). *T. gondii* seropositive sheep usually present cysts which can be found in various edible tissues of these animals (Dubey & Kirkbride 1989, Lunden & Uggla 1995). The risk of infection in humans is a factor to be considered, since there reports of individuals who were infected through ingestion of meat or your products (Tenter et al. 2000). *N. caninum* DNA was not detected in tested samples. Nonetheless, it is well known that in sheep, natural infection with this parasite is unusual and only a few cases of abortion and congenital diseases have been reported for this specie (Corbellini et al. 2001, Dubey 2003). It is possible that this low frequency of detection is related to a higher concentration of cysts in the brain of infected animals with *N. caninum* (Dubey & Lindsay 2006).

CONCLUSIONS

Results have shown a high occurrence of microscopic tissue cysts in cardiac muscle of the sheep from the Southwest of Rio Grande do Sul.

Although PCR assay presented a low sensitivity to identify the causative agents of these cysts, we determined the presence of *Sarcocystis* spp. and *Toxoplasma gondii* in myocardial samples from sheep, which can be a risk factor for animal and human contamination, not only through consumption, but also through handling the carcasses of these animals.

REFERENCES

- Adriana T., Mircean V., Blaga R., Bratu C.N. & Cozma V. 2008. Epidemiology and etiology in sheep sarcocystosis. *Bull. UASVM* 65:49-54
- Alfonso Y., Fraga J. & Jiménez N. 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. *Exp. Parasitol.* 122(3):203-207.
- Banerjee P.S. 1998. Studies on pathogenesis of *Sarcocystis tenella* in sheep. *J. Vet. Parasitol.* 12:65.
- Bell A.S. & Ranford-Cartwright L.C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.* 18:337-342.
- Corbellini L.G., Colodel E.M. & Driemeier D. 2001. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:416–419.
- Dubey J.P. & Kirkbride C.A. 1989. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195:1715-1716.
- Dubey J.P., Speer C.A. & Charleston W.A.G. 1989. Ultrastructural differentiation between sarcocysts of *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis hominis*. *Vet. Parasitol.* 34:153-157.
- Dubey J.P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Kor. J. Parasitol.* 41:1–16.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. 2006. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Vet. Clin. Food Anim.* 22:645-671.
- Dubey J.P., Schares G. & Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*, *Clin. Microbiol. Rev.* 20(2):323-367.
- Dubey J.P. & Jones J.L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38(11):1257-1278.
- Dubey J.P. 2009. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. CRC Press, Boca Ranton. Florida.

- Ginawi M.A. & Shommein A.M. 1977. Prevalence of sarcocystosis in sheep, goats and camels in the Sudan. *J. Vet. Sci. Anim. Husbandry*. 18:92-97.
- Gondim L.F. 2006. *Neospora caninum* in wild life. *Trends Parasitol.* 22:247-252.
- Hamidinejat H., Moetamedi H., Alborzi A. & Hatami A. 2014. Molecular detection of *Sarcocystis* species in slaughtered sheep by PCR-RFLP from south-western of Iran. *J. Parasit. Dis.* 38(2):233-237.
- Heckerroth A.J. & Tenter A.M. 1999. Comparison of immunological and molecular methods for the diagnosis of infections with pathogenic *Sarcocystis* species in sheep. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23(6):293-302.
- Heckerroth A.J. & Tenter A.M. 2007. Aetiological diagnosis, p.172-232. In: Ortega-Mora L.M., Gottstein B., Conraths F.J. & Buxton D. (Eds), *Protozoal abortion in farm ruminants: guidelines for diagnosis and control*, CAB International, UK.
- Latif B.M.A., Al-Delemi J.K., Mohammed B.S., Al-Bayati S.M. & Al-Amiry A.M. 1999. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in meat-producing animals in Iraq. *Vet. Parasitol.* 84:85-90.
- Lundén A. & Uggla A. 1995. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int. J. Food Microbiol.* 15:357-363.
- Moré G., Basso W., Bacigalupe D., Venturini M.C. & Venturini L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol. Res.* 102:671-675.
- Moré G., Abrahamovich P., Jurado S., Bacigalupe D., Marin J.C., Rambeaud M., Venturini L. & Venturini M.C. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet. Parasitol.* 177:162-165.
- Piergili Fioretti D. 2004. Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. *Parasitology* 46:177-181.
- Saito M. 1984. A new simple method for detection of bovine *Sarcocystis* cystis. *Vet. Jap.* 37:158-162.
- Tenter A.M. 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int. J. Parasitol.* 25(11):1311-1330.

- Tenter A.M. & Johnson A.M. 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv. Parasitol* 39:69-139.
- Tenter A.M., Heckeroth A.R. & Weiss L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30:1217-1258.
- Thornton H. 1972. Sarcosporidiosis: a review. *Trop. AnimHealth Prod.* 4:54-57.
- Yang Z.Q. & Zuo Y.X. 2000. The new views of the researchers on cyst forming coccidian species including *Sarcocystis* by using the molecular biological techniques. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* 18:120-126.
- Zheng Xiang, Xinwen Chen, Lijun Yang, Yongshu He, Runsheng Jiang, Benjamin M. Rosenthal, Pengtao Luan S.W., Attwood Yangxian Zuo, Ya-Ping Zhang & Zhaoqing Yang 2009. Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. *Parasitol. Int.* 58(3):293-29.

Table 1. Target gene amplified by polymerase chain reaction (PCR), with primer sequences and base pair size (bp) of PCR amplification products of *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*

	Target gene	Primer sequence	Amplified product
<i>Sarcocystis</i> spp.	18s rDNA	F: CGCAAATTACCCAATCCTGA R: ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG	700bp
<i>Toxoplasma gondii</i>	B1	F:CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT R: CCCAGCTGCGTCTGTCGGGAT	451bp
<i>Neospora caninum</i>	Nc5	F: CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC R: CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	328bp

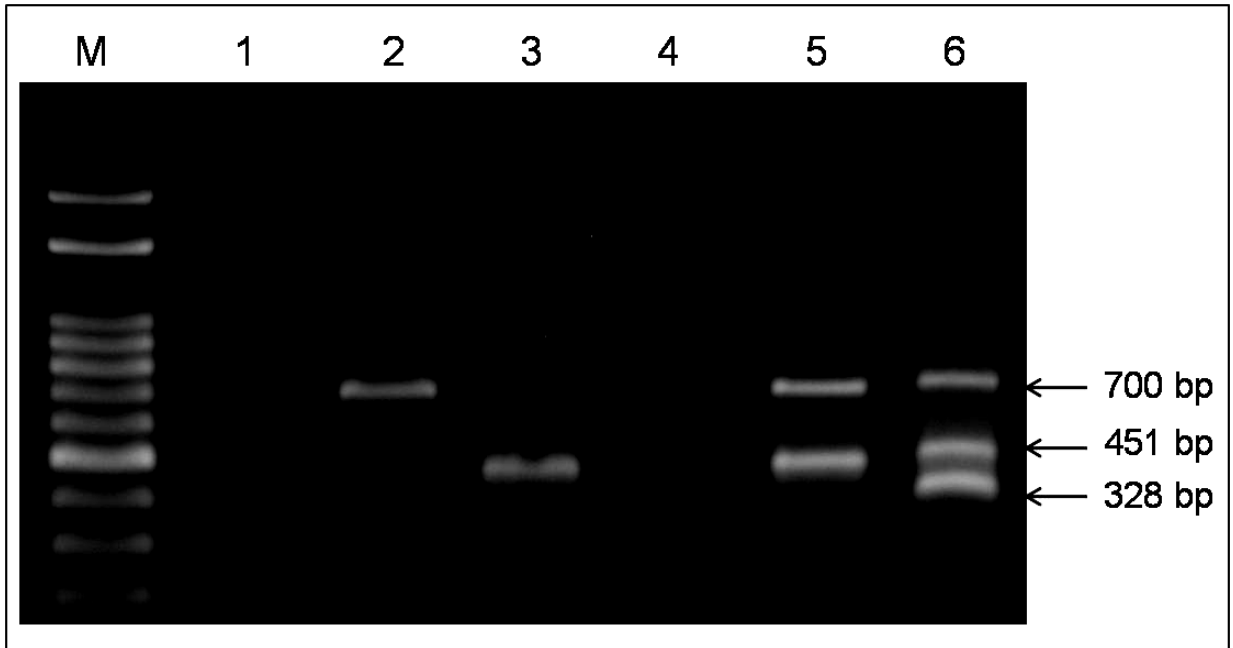


Fig.1. Protozoa DNA detection by PCR in myocardium samples from ovines. *Sarcocystis* spp. (700bp); *Toxoplasma gondii* (451bp) and *Neospora caninum* (328bp). Lane M: Molecular weight marker (100bp); lane 1: negative control; lanes 2, 3, 4, 5: myocardium samples; lane 6: positive control.

3 CAPÍTULO 2

(Artigo à ser submetido a revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”)

Prevalência de anticorpos para *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii*, associado a ausência de cistos teciduais de *Sarcocystis neurona* em equinos³

Luiza P. Portella⁴, Gustavo C. Cadore⁴, Luís A. Sangioni⁴, Luis Fernando Vilani de Pellegrin⁵,
Rafael Figuera⁶, Fernanda S.F. Vogel^{4*}

RESUMO- Portella L.P., Cadore G.C., Sangioni L.A., Pellegrin L.F.V., Figuera R., & Vogel F.S.F. 2014. [Prevalência de anticorpos para *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii*, associado a ausência de cistos teciduais de *Sarcocystis neurona* em equinos]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: fefevogel@gmail.com

A Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP) é uma enfermidade neurológica que acomete equinos e possui como principal agente o protozoário *Sarcocystis neurona*. Porém o papel dos equinos no ciclo deste protozoário não está completamente esclarecido. O objetivo deste trabalho foi elucidar o papel dos equinos como hospedeiros intermediários no ciclo do protozoário *S. neurona*, através da ocorrência de cistos nestes animais e determinar a frequência de detecção de anticorpos anti- *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *T. gondii* em equinos abatidos em frigorífico no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletadas 197

³ Recebido em

Publicado em

⁴ Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. *Corresponding author: fefevogel@gmail.com

⁵ Setor de Indústria e Inspeção de Carnes, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

⁶ Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

amostras de soro e coração de equinos. Das amostras pesquisadas, não houve detecção de cistos, ácidos nucleicos ou alterações histopatológicas relacionadas ao *Sarcocystis* spp. Relacionado com a detecção de anticorpos, 146 (74,1%) foram positivos para pelo menos um dos protozoários pesquisados. Anticorpos para *Sarcocystis* spp. foram encontrados em 36% (71/197), para *Neospora* spp. em 39,1% (77/197) e para *T. gondii* em 47,2% (93/197). Assim a não detecção de cistos teciduais, associado com a detecção de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp., reforça a participação dos equinos como hospedeiros acidentais no ciclo deste protozoário, minimizando a participação destes animais na epidemiologia da infecção por *Sarcocystis* spp.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp., *Toxoplasma gondii*, PCR, diagnóstico.

ABSTRACT - [Prevalence of antibodies to *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii*, associated with absence of tissue cists of *Sarcocystis neurona* in horses] Equine protozoal myeloencephalitis is a neurologic disease of horses, most often caused by the *Sarcocystis neurona*. However, the role of horses in the life cycle this parasite is not completely understood. This study attempts to elucidate the role of horses as intermediate hosts in *S. neurona* cycle, through occurrence of cysts in these animals and determine the antibodies frequency for *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. and *T. gondii* in slaughtered horses. Were collected 197 serum and heart samples of equines. None of the myocardium samples were detected tissue cysts, nucleic acids or histopathological changes associated to *Sarcocystis* spp. In antibodies detection, 146 (74.1%) serum samples were positive for studied protozoa. Antibodies against *Sarcocystis* spp. were detected in 36% (71/197), to *Neospora* spp. in 39.1% (77/197) and to *T. gondii* in 47,2% (93/197). Thus, the failure in detect tissue cysts, associated with antibodies anti-*Sarcocystis* spp. detection, increases the role of horses as accidental hosts in the cycle this protozoan, declining your participation in the epidemiology of *Sarcocystis* infection.

INDEX TERMS: *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp., *Toxoplasma gondii*, PCR, diagnostic

INTRODUÇÃO

Os protozoários *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* são parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa capazes de causar encefalomiélites em equinos. A

Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP), conhecida por ser uma doença neurológica, é comumente causada pelo *S. neurona*, sendo uma doença grave e debilitante (Dubey et al. 2001a). O diagnóstico da MEP, geralmente é baseado na sorologia e também nos sinais clínicos apresentados pelos animais (Johnson et al. 2010), que são variáveis dependendo da região do sistema nervoso central afetada (Blythe et al. 1997, Granstrom & Saville 2000).

Os equinos adquirem a infecção pelo *S. neurona* após ingestão de esporocistos excretados nas fezes de gambás (*Didelphis* sp.), que são os hospedeiros definitivos (Fenger et al. 1995, Dubey et al. 2001). Embora os equinos sejam considerados hospedeiros acidentais deste protozoário (Dubey et al. 2001b, Dubey et al. 2006), Mullaney et al. (2005) sugerem que estes animais sejam hospedeiros intermediários naturais do *S. neurona*, uma vez que detectaram ocorrência de cistos na musculatura destes animais.

O *T. gondii* e o *Neospora caninum*, são dois gêneros de protozoários muito semelhantes biologicamente (Dubey et al. 2007, Dubey 2009). A neosporose é amplamente conhecida pela infecção em bovinos, porém outras espécies também são infectadas. Dentre estas, os equinos têm importância principalmente devido a ser um dos agentes relacionados à MEP, mesmo em menor frequência que o *S. neurona*. Os equinos podem ser infectados tanto pelo *N. caninum* quanto pelo *Neospora hughesi* (Lindsay 2001). A infecção dos equinos ocorre principalmente pela ingestão de oocistos excretados pelos hospedeiros definitivos (McAllister et al. 1996). A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *T. gondii*, sendo que sua infecção em equinos normalmente ocorre de forma subclínica (Al-khalidi & Dubey 1979). Entretanto, sinais clínicos caracterizados por hiperirritabilidade, incoordenação motora, distúrbios oculares e abortos já foram relatados (Dubey & Portefield 1986, Turner & Savva 1991).

Tendo em vista a importância dos protozoários do filo Apicomplexa em equinos, o objetivo deste trabalho foi elucidar o papel dos equinos como hospedeiros intermediários no ciclo do protozoário *S. neurona*, através da ocorrência de cistos nestes animais e determinar a frequência de detecção de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *T. gondii* em equinos abatidos em frigorífico no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material

Amostras de soro sanguíneo e coração de 197 equinos foram coletados em frigorífico sob Inspeção Federal (SIF). Os equinos abatidos eram provenientes dos Estados Rio Grande

do Sul e Paraná, com idade variando entre 6 meses a 18 anos. A coleta de sangue foi realizada após a sangria dos animais e para obtenção do soro, o sangue total foi centrifugado a 250g por 10 minutos, sendo estocado a -20°C até a realização dos testes. Os corações foram coletados e armazenados individualmente em sacos plásticos identificados e mantidos refrigerados até seu processamento.

Exame direto e exame histopatológico

Para o exame direto, foram realizadas avaliações individuais em cada amostra de coração coletado. Uma porção de 50g foi macerada e homogeneizada com tampão fosfato-salino (PBS) e filtrado com gaze. O conteúdo coletado foi visualizado em microscópio invertido para pesquisa de cistos de *Sarcocystis* spp. Para o exame histopatológico, 50 corações foram selecionados, sendo realizados cortes transversais em cada amostra. Os fragmentos resultantes foram fixados em formol tamponado a 10%. Após sete dias de fixação, os fragmentos foram clivados, processados histologicamente e corados pela hematoxilina e eosina. As lâminas resultantes foram analisadas em microscópio óptico.

Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram selecionadas 50 amostras aleatoriamente para extração de DNA. Aproximadamente 50mg de cada amostra de músculo cardíaco foi utilizado para extração, utilizando kit comercial (Wizardgenomic DNA purification, Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, com modificações no passo de lise conforme Moré et al. (2011).

A técnica de PCR para detecção do DNA de *Sarcocystis* spp., foi realizada com iniciadores que amplificam a região 18s rDNA deste protozoário (*forward*: 5'-CGCAAATTACCCAATCCTGA - 3' e *reverse*: 5'- ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG - 3'). A reação de PCR foi realizada com um volume final de 25µL, contendo 5µL do Tampão GoTaq®, 10µM de cada iniciador, 200µM de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1U de DNA Polimerase GoTaq®, 1µL de DNA molde (~50ng) e água ultra pura. A amplificação foi realizada utilizando uma desnaturação inicial (95°C por 4 minutos), seguida por 40 ciclos (94°C por 40 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos), com uma extensão final (72°C por 6 minutos). Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1%, corado com GelRed® (Biotium Inc. , CA, USA).

Detecção de anticorpos

A detecção de imunoglobulinas G (IgG) anti-*Sarcocystis* spp., anti-*Neospora* spp. e anti-*Toxoplasma gondii* foi realizada através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para detecção destes anticorpos, foram utilizados como antígeno, merozoítos de *S. neurona* da cepa SN-37R cultivados em células da linhagem CV-1 (*African Green Monkey kidney cells*). Taquizoítos da cepa NC-1 de *N. caninum* e da cepa RH de *T. gondii*, foram mantidos em cultivo celular da linhagem VERO (*African Green Monkey kidney cells*). Todos os cultivos celulares foram mantidos a 37°C, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa de CO₂ a 5%.

Para a realização da RIFI, as amostras de soro foram diluídas em 1:50, para todos os protozoários testados. Anticorpo anti-IgG equina conjugado a fluoresceína (Goat Anti-Equine IgG FITC®, 160A, Southern Biotech, Oxmoor Blvd, Birmingham, USA) foi usado como anticorpo secundário na reação. Amostras de soro conhecidamente positivo e negativo, quanto à presença de anticorpos contra *S. neurona*, *Neospora* spp. e *T. gondii* foram utilizados como controles em cada lâmina. Foram consideradas positivas, as amostras em que houve fluorescência em toda a superfície dos protozoários testados e negativas as amostras em que a fluorescência era apical ou ausente.

RESULTADOS

O exame direto do músculo cardíaco realizado em 197 amostras foi negativo para a detecção de cistos de *Sarcocystis* spp. Nas 50 amostras selecionadas para realização de PCR, não houve detecção de ácidos nucléicos. A análise histopatológica não evidenciou alterações morfológicas nos cortes avaliados, sendo que nenhum cardiomiócito apresentou cistos ou lesões compatíveis com *Sarcocystis* spp. Ressalta-se que 50 amostras de músculo cardíaco avaliadas no exame histopatológico, 21 (42%) eram provenientes de animais soropositivos para *Sarcocystis* spp.

Na detecção de anticorpos dos 197 equinos avaliados por RIFI, 146 (74.1%) foram positivos para pelo menos um dos protozoários pesquisados. Anticorpos para *Sarcocystis* spp. foram encontrados em 36% (71/197), para *Neospora* spp. 39.1% (77/197) e para *T. gondii* 47,2% (93/197). Em 19 amostras foram detectados anticorpos para os três protozoários (9,6%). A sorologia de animais reagentes apenas para *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *T. gondii*, foram detectados em 9,1% (18/197), 12,2% (26/197) e 13,2% (26/197) respectivamente.

DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi contribuir para a epidemiologia da infecção por *S. neurona* em equinos. Através da detecção de cistos na musculatura cardíaca destes animais, buscou-se determinar o papel dos equinos como possíveis hospedeiros intermediários no ciclo deste protozoário. Para a maioria dos autores, os equinos são considerados hospedeiros acidentais cuja infecção não determina a formação de cistos teciduais (Dubey et al. 2001b, Dubey et al. 2006) e desta forma esta espécie não apresentaria importância epidemiológica e sim clínica. No entanto, Mullaney et. al (2005), através de exame histopatológico, encontraram cistos no tecido muscular da língua de um equino com sinais clínicos de MEP, confirmando por PCR e RFLP a presença de DNA de *S. neurona*. Assim, torna-se evidente a necessidade de mais trabalhos que visem contribuir para o esclarecimento do papel epidemiológico dos equinos no ciclo do deste protozoário. Neste trabalho, não foram encontrados cistos e nem DNA de *S. neurona* em amostras de miocárdio dos equinos avaliados, o que reforça a hipótese da participação dos equinos na epidemiologia desta infecção como hospedeiros acidentais/ finais.

Das 50 amostras de miocárdio, avaliadas por exame direto, histopatológico e pela pesquisa de DNA por PCR, em 21 foram detectados anticorpos anti- *Sarcocystis* spp. no soro sanguíneo destes animais. Este resultado indica que estes equinos foram expostos a antígenos de *Sarcocystis* spp. oriundos provavelmente de uma infecção natural. Existem outras três espécies de *Sarcocystis* que infectam equinos e realizam formação de cistos em sua musculatura esquelética – *S. bertrami*, *S. equicanis* e *S. fayeri* (Levine 1986). A não detecção de cistos demonstrada neste trabalho, associado com a presença de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp., contribui para a hipótese de que estes equinos tenham sido naturalmente infectados pelo *S. neurona* e que este protozoário não forma cistos teciduais nesta espécie animal.

A importância da infecção pelo *S. neurona* no Brasil está relacionada a casos de MEP (Masri et al. 1992, Lins et al. 2012) e a presença do hospedeiro definitivo (Dubey et al. 2001c). Dubey et al. (2001c) detectam pela primeira vez a presença de *S. neurona* a partir de isolamento em esporocistos de gambás (*Didelphis albiventris*) oriundos do Brasil, assim demonstraram a circulação deste protozoário no território brasileiro e caracterizaram esta espécie como hospedeiro definitivo de *S. neurona*. Estes animais são característicos da zona rural, geralmente em matas, porém com o aumento do desmatamento os gambás se deslocam cada vez para mais próximo de fazendas, sítios e meio urbano em busca de alimento, aumentando a possibilidade de contaminação ambiental, favorecendo a infecção dos equinos

(Radostits et al., 2002). Com a detecção de anticorpos, associado aos animais serem de áreas endêmicas para o hospedeiro definitivo, a não detecção de cistos teciduais sugere o papel dos equinos como hospedeiros finais.

Na análise dos dados de sorologia, o índice de 36% (71/197) de animais soropositivos para *Sarcocystis* spp. obtido é semelhante aos 35% encontrados na Argentina (Dubey et al. 1999a) e aos 35,6 % no Brasil (Dubey et al. 1999b). No entanto, Hoane et al. (2006) detectaram índice de 69,6% em equinos naturalmente infectados no Brasil. Estes resultados demonstram a ampla disseminação deste protozoário no Brasil provavelmente em decorrência da contaminação ambiental por esporocistos e oocistos deste protozoário.

Relacionado a neosporose em equinos, sua ocorrência já foi descrita em diversos países, com taxas de infecção variando principalmente em decorrência da amostragem e ao tipo de teste empregado no diagnóstico (Pitel et al. 2001, Vardeleon et al. 2001, Gupta et al. 2002). A frequência de anticorpos detectados para *Neospora* spp. de 39,1% (77/197) é relativamente alta quando comparada com outro trabalho realizado no Brasil, que foi de 15,4% em animais de tração (Sangioni et al. 2011). Porém em estudo realizado por Locatelli-Dittrich et al. (2006) com equinos no estado do Paraná, a ocorrência de animais positivos foi de 47%. Este resultado evidencia que o *Neospora* spp. está presente na população de equinos estudada e provavelmente a fonte de infecção seriam oocistos excretados por cães (Gondim et al. 2004) ou por via transplacentária (Dubey & Porterfield 1990).

A infecção pelo *T. gondii* em equinos já foi relatada com índices de detecção de anticorpos variando entre 4,4% a 41,5% (Costa et al. 1986, Vidotto et al. 1997, Garcia et al. 1999). Neste trabalho, a ocorrência de anticorpos para o *T. gondii* de 47,2% (93/197) pode ser considerada alta quando comparada a maioria dos trabalhos (Mendonça et al. 2001).

A detecção de anticorpos encontrada no presente estudo, para os três agentes avaliados, *Sarcocystis* spp (36%), *Neospora* spp. (39,1%) e *T. gondii* (47,2%) é relativamente alta, o que pode ser relacionada a origem das amostras. A maioria dos animais amostrados tinha mais de 10 anos de idade (85% - dados não mostrados) o que possibilita maior probabilidade de infecção dos animais.

CONCLUSÃO

A não detecção de cistos teciduais associado com a detecção de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp., reforça a participação dos equinos como hospedeiros acidentais/finais no ciclo deste protozoário. Estes resultados encontrados, minimizam a participação destes

animais na epidemiologia da infecção por *Sarcocystis* spp., enfatizando assim sua importância clínica nos equinos. Além disto, os resultados indicam a ampla disseminação da infecção por *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em equinos.

REFERÊNCIAS

- Al-Khalidi N.W. & Dubey J.P. 1979. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. J. Parasitol., 65:331-334.
- Blythe L.L., Granstrom D.E., Hansen D.E., Walker L.L., Bartlett J., Stamper S. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. Journal of the American Veterinary Medical Association 210: 525-527.
- Costa A.J., Ishizuka M.M., Marques L.C., Vidotto O., Rocha U.F., Ikeda A.I. 1986. Toxoplasmosis frequency in equines from the north region of São Paulo State, Brazil. *Ars Vet.* 2:75-79.
- Dubey J.P., Porterfield M.L. 1986. Toxoplasma-like sporozoa in an aborted equine fetus. Journal of American Veterinary Medical Association. 188:1312-1313.
- Dubey J.P. & Porterfield M.L. 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. J. Parasitol. 76:732-734.
- Dubey J.P., Venturini M.C., Venturini L., McKinney J., & Pecoraro M. 1999a. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 86:59-62.
- Dubey J.P., Kerber C.E., Granstrom, D.E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 215:970-972.
- Dubey J.P., Lindsay D.S., Saville W.J.A., Reed S.M., Granstrom D.E., Speer C.A. 2001a. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*, 95:89-131.

- Dubey J.P., Lindsay D.S., Fritz D., Speer C.A. 2001b. Structure of *Sarcocystis neurona* sarcocysts. *J. Parasitol.* 87:1323–1327.
- Dubey J.P., Lindsay D.S., Kerber C.E., Kasai N., Pena H.P.J., Gennari S.M., Kwok O.C.H., Shen S.K., Rosenthal B.M. 2001c. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 95:295-304.
- Dubey J.P., Chapman J.L., Rosenthal, B.M., Mense M., Schueler R.L. 2006. Clinical *Sarcocystisneurona*, *Sarcocystis canis*, *Toxoplasma gondii*, and *Neosporacanium* infections in dogs. *Vet. Parasitol.* 137, 36-49.
- Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:323-367.
- Dubey J.P., Jenkins M.C., Kwok O.C.H., Zink R.L., Michalski M.L., Ulrich V., Carstensen M., Thulliez P. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests. *Vet. Parasitol.*, 161:330-334.
- Fenger C.K., Granstrom D.E., Langemeier J.L., Stamper S., Donahue J.M., Patterson J.S., Gajadhar A.A., Marteniuk J.V., Xiaomin Z., Dubey J. P. 1995. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. *Journal of Parasitology*, 81:916-919.
- Garcia J.L., Navarro I.T., Ogawa L., Oliveira R.C.D. 1999. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. *Ciência Rural*, 29: 91-97.
- Gondim L.F., McAllister M.M., Pitt W.C., Zemlicka, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology*, 34:159-161.

- Granstrom D.E., Saville W.J. Doenças neurológicas. In: Reed SM. Medicina interna equina. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 419-22.
- Gupta, G. D., Lakritz, J., Kim, J. H., Kim, D. Y., Kim, J. K., & Marsh, A. E. 2002. Seroprevalence of *Neospora* spp., *Toxoplasma gondii*, and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. *Veterinary Parasitology*, 106:93-201.
- Hoane J.S., Gennari S.M., Dubey J.P., Ribeiro M.G., Borges A.S., Yai L.E.O., Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Bonesi G.L., Howe D.K. 2006. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Veterinary Parasitology*, 136:155-159.
- Johnson A.L., Burton A.J., Sweeney, R.W. 2010. Utility of 2 Immunological Tests for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in Naturally Occurring Cases, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24:1184–1189.
- Levine N.D. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. *The Journal of Parasitology*, 72:372–382. 1986.
- Lindsay D.S. 2001. Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses. *Equine Veterinary Journal*, 33:116-118.
- Lins L.A., Feijó L.F., Nogueira C.E.W., 2012. Mieloencefalite protozoária equina nas regiões da Campanha e do sul do Rio Grande do Sul no período de 1998-2006. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 11:248-250.
- Locatelli-Dittrich R., Dittrich J.R., Richartz R.R., Gasino Joineau M.E., Antunes J., Pinckney R.D., Deconto I., Hoffmann D.C., Thomaz-Soccol V. 2006. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 135:215–221.

- Masri M.D., Lopez de Alda J., Dubey J.P. 1992. *Sarcocystis neurona* -associated ataxia in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 44:311-314.
- McAllister M.M., Parmley S.F., Weiss L.M., Welch V.J., McGuire A.M. 1996. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *J. Parasitol.*, 82:354–355.
- Mendonça A.O., Cerqueira E.J.C., Araujo W.N., Silva E.M., Shimabukuro F.H., Sarkis D.T., Sherlock I., Langoni H. 2001. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do Estado da Bahia, Brasil. *Semina Ciências. Agrárias*, 22:15-118.
- Moré G., Abrahamovich P., Jurado S., Bacigalupe D., Marin J.C., Rambeaud M., Venturini L. & Venturini M.C. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet. Parasitol.* 177:162-165.
- Mullaney T., Murphy A.J., Kiupel M., Bell J.A., Rossano M.G., Mansfield L.S. 2005. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. *Veterinary Parasitology*, 133:27–36.
- Pitel P.H., Pronost S., Romand S., Thulliez P., Fortier G., Ballet J.J. 2001. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. *Equine Veterinary Journal*, 33:205-207.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. *Clínica Veterinária. Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. Nona edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2002. 1737p.
- Sangioni L.A., Botton S.A., Cargnelutti J.F., Cadore G.C., Cezar A.S., Weiblen R., Lopes S.T.A., Vogel F.S.F. 2011. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora* spp. e anti-herpersvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 41:21-323.

- Turner C.B., Savva D. 1991. Detection of *Toxoplasma gondii* in equine eyes Veterinary Record. 129:128.
- Vardeleon D., Marsh A.E., Thorne J.G., Loch W., Young R., Johnson P.J. 2001. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. Veterinary Parasitology, 95:273-282.
- Vidotto O., Kano F.S., Freire R.L., Mitsuka R., Ogawa L., Bonesi G., Navarro I., Franciscon F.S.G. 1997. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em eqüinos procedentes de quatro estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR. Semina Ciências Agrárias, 18:9-13.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos experimentos realizados permitem concluir que:

1. Existe uma alta ocorrência de cistos teciduais de *Sarcocystis* spp. em ovinos na região sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul.
2. O PCR não apresentou boa sensibilidade para detecção dos agentes causadores de cistos nos ovinos.
3. Foi possível a detecção de *Sarcocystis* spp. e *Toxoplasma gondii* nas amostras de músculo cardíaco dos ovinos testados.
4. A não detecção de cistos teciduais e ácidos nucleicos, associada a detecção de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp., reforça a participação dos equinos como hospedeiros acidentais/finais do protozoário *S. neurona*.
5. A alta detecção de anticorpos para *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* ressalta a ampla disseminação desses protozoário na população equina

REFERÊNCIAS

- ADRIANA, T. et al. Epidemiology and etiology in sheep sarcocystosis. **Bull. UASVM Vet. Med.** v. 65, p. 49-54, 2008.
- BORJI, H.; AZIZZADEH, M.; KAMELLI, M. A retro-spective study of abattoir condemnation due to parasitic infections: Economic importance in Ahwaz, southwestern Iran. **Journal of Parasitology.** v.98, p. 954-957, 2012.
- BOTELHO, G. G.; LOPES, C. W. G. Esporocistos de *Sarcocystis cruzi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em linfonodos mesentéricos de cães. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 7, n. 1, p. 87-88, 1984.
- CAWTHORN, R. et al. In vitro excystation of *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis cruzi*, and *Sarcocystis tenella* (Apicomplexa). **Journal of Parasitology.**, v. 72, p. 880-884, 1986.
- COWEN, N. D.; McKAY, R. J. Interpreting immunoblot testing of cerebrospinal fluid for equine protozoal myeloencephalitis. **Compendium on Continuing Education Practice Veterinarian (Equine)**, v. 19, p. 1176-1181, 1997.
- CORLISS, J. O. An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**, v. 33, p. 1-1, 1994.
- DUARTE, P. C., et al. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two *Western Blotting* tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 15, p. 8-13, 2003.
- DUBEY, J. P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, p. 1061-1078, 1976.
- DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; EPLING, G. P. Sarcocystosis in newborn calves fed *Sarcocystis cruzi* sporocysts from coyotes. **Am. J. Vet. Res.**, v. 43, p. 2147-2164, 1982.
- DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man.** Boca Raton: CRC Press, 1989.

DUBEY, J. P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **JAVMA**, v. 169, p. 1061-1078, 1976.

DUBEY, J. P., et al. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 59-62, 1999.

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

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.** v. 22, p. 645-671. 2006.

ELSHEIKHA, H. M. Has *Sarcocystis neurona* (Sporozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae) cospeciated with its intermediate hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 307-14, 2009.

FAYER, R.; JOHNSON, A. J. *Sarcocystis fusiformis*: development of cysts in calves infected with sporocysts from dogs. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, v. 41, p. 105-108, 1974.

HAMIDINEJAT, H. et al. Prevalence and distribution patterns of *Sarcocystis* in camels in Yazd prov-ince, Iran. **J Parasit Dis.** v. 25, p. 1-2, 2012.

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.; BURTON, A. J.; SWEENEY, R. W. 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.

LEVINE, N. D. The taxonomy of *Asrcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. **The Journal of Parasitology**, v. 72, p. 372-382, 1986.

MACKAY, R. J.; DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Equine protozoal myeloencephalitis. **Compendium on Continuing Education Practice Veterinary**, v. 14, p. 1359-1367, 1992.

MACKAY, R. J. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 13, p. 79-86, 1997.

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

NOUROLLAHIFARD, S. R.; ASGHARI, M.; NOURI, F. Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered cattle in Kerman, Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 4, p. 1633-1636, 2009.

OBENDORF, D. L.; MUNDAY, B. L. Experimental infection with *Sarcocystis medusiformis* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 59-65, 1987.

PESCADOR, C. A., et al. Aborto ovino associado com infecção por *Sarcocystis* sp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 393-397, 2007.

POWELL, E. C., et al. Types of myofibers parasitized in experimentally induced infections with *Sarcocystis cruzi* and *Sarcocystis capracanis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 514-517, 1986.

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

SAVILLE, W. J. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 519-524, 1997.

SHEFFIELD, H. G.; FAYER, R. Fertilization in the coccidia: fusion of *Sarcocystis bovicanis* gametes. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.**, v. 47, p. 118-121, 1980.

STANEK, J. F. et al. Epidemiology of *Sarcocystis neurona* infections in domestic cats (*Felis domesticus*) and its association with equine protozoal myeloencephalitis (EPM) case farms and feral cats from a mobile spay and neuter clinic. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 239-49, 2003.

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

TILLOTSON, K. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 10, p. 122-126, 1999.

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