

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

Maiara Sanitá Tafner Ferreira

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *SARCOCYSTIS*
spp. EM BOVINOS**

Santa Maria, RS, Brasil

2018

Maiara Sanitá Tafner Ferreira

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *SARCOCYSTIS* spp. EM BOVINOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS, Brasil

2018

Maiara Sanitá Tafner Ferreira

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *SARCOCYSTIS* spp. EM BOVINOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 **Doutor em Medicina Veterinária**

Aprovado em 28 de fevereiro de 2018:

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

Luis Antonio Sangioni (UFSM)

Gustavo Cauduro Cadore (UFSM)

Alfredo Skrebsky Cezar (UNIJUI)

Gustavo Toscan (UNIJUI)

Santa Maria, RS

2018

RESUMO

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *SARCOCYSTIS* spp. EM BOVINOS

AUTOR: Maiara Sanitá Tafner Ferreira

ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Testes sorológicos são frequentemente utilizados para confirmar a infecção por *Sarcocystis* spp. e também são úteis para avaliação de um grande número de amostras. Testes moleculares proporcionam a detecção e caracterização de espécies de *Sarcocystis*. Portanto, os objetivos deste estudo foram: (1) investigar a infecção por *Sarcocystis* spp. em corações de bovinos, através de exame microscópico direto, reação em cadeia pela polimerase (PCR), polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP) e sequenciamento de DNA; (2) investigar a infecção por *Sarcocystis* spp. em bovinos pelo exame microscópico direto, confirmar a identidade dos sarcocistos por PCR e avaliar e correlacionar seus resultados com o diagnóstico sorológico dos bovinos pela imunofluorescência indireta; (3) comparar a imunofluorescência indireta (RIFI) e método de *Dot-Blot* para diagnóstico sorológico de infecção por *Sarcocystis* spp. em camundongos experimentalmente infectados e detectar possíveis reações sorológicas cruzadas com *N. caninum* e *T. gondii*. No Capítulo 1 desta tese apresenta-se um estudo no qual amostras de miocárdio de 314 bovinos foram coletadas de um frigorífico e analisadas quanto a ocorrência de sarcocistos por microscopia óptica. Sarcocistos isolados de 134 destes corações foram submetidos à extração de DNA e PCR. O DNA amplificado foi digerido com enzimas de restrição BclI e RsaI para diferenciação entre *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*. A espécie de *Sarcocystis* identificada foi confirmada por sequenciamento de DNA. Sarcocistos foram detectados em todas as amostras de miocárdio de bovinos avaliadas. A PCR-RFLP e sequenciamento de DNA resultaram na identificação de *S. cruzi*. No estudo apresentado no Capítulo 2 foram coletadas amostras de miocárdio e sangue de 50 bovinos adultos de um frigorífico. Cada miocárdio foi submetido a exame microscópico a fresco para pesquisa de cistos compatíveis com *Sarcocystis* spp. Dez sarcocistos foram coletados de cada amostra e processados para extração de DNA seguida de PCR para diagnóstico molecular de *Sarcocystis* spp. A presença de anticorpos contra o parasito foi testada pela RIFI no soro sanguíneo. A frequência de detecção de sarcocistos pelo exame a fresco foi de 100% (50/50). Anticorpos específicos contra *Sarcocystis* spp. foram detectados em 96% (48/50) e 80% (40/50) das amostras de soro testadas na diluição de 1:25 e 1:200, respectivamente. DNA de *Sarcocystis* spp. foi amplificado pela PCR em 86% (43/50) dos cistos coletados. Os métodos empregados permitiram detectar a infecção por *Sarcocystis* spp. e a RIFI mostrou uma sensibilidade satisfatória em comparação com exame microscópico a fresco. No estudo apresentado no Capítulo 3, foram realizados exames sorológicos (RIFI e *Dot-blot*) de camundongos inoculados com *Sarcocystis* spp. ou *N. caninum* ou *T. gondii*. *Dot-Blot* demonstrou mesma sensibilidade e especificidade que a RIFI para diagnóstico sorológico de *Sarcocystis* em camundongos experimentalmente infectados e este teste não demonstrou reação sorológica cruzada com *N. caninum* e *T. gondii*.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular. Sequenciamento de DNA. Testes sorológicos. Protozoários.

ABSTRACT

LABORATORIAL DIAGNOSIS OF *SARCOCYSTIS* spp. IN CATTLE

AUTHOR: Maiara Sanitá Tafner Ferreira

ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

Serological tests are frequently performed to confirm *Sarcocystis* spp. infection and they also are suitable to evaluate a large number of samples. Molecular tests provide detection and characterization of species. Therefore, the aims of the study were: (1) investigate *Sarcocystis* spp. infection in cattle hearts through direct microscopic examination, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing (2) detect *Sarcocystis* spp. infection in cattle through direct microscopic examination, confirm sarcocysts identity by PCR and evaluate and correlate these results with the serological diagnosis of cattle by indirect immunofluorescence (3) compare indirect immunofluorescence (IFAT) and *Dot-Blot* method for serological diagnosis of *Sarcocystis* spp. in experimentally infected mice and detect serological cross-reactions with *N. caninum* and *T. gondii*. Chapter 1 of this thesis presents a study that myocardium samples were collected from 314 bovine in an abattoir and analyzed for the occurrence of sarcocysts by light microscopy. Sarcocysts isolated from 134 of these hearts were submitted to DNA extraction and PCR. PCR-amplified DNA fragments were digested with the restriction enzymes BclI and RsaI aiming the differentiation among *S. cruzi*, *S. hirsuta*, and *S. hominis* and the identified *Sarcocystis* species was confirmed by DNA sequencing. Sarcocysts were detected in all bovine myocardium samples. PCR-RFLP and DNA sequencing resulted in identification of *S. cruzi*. In the study presented in Chapter 2, myocardium and blood samples from 50 adult beef cattle were collected from a slaughterhouse. Each myocardium was submitted to fresh microscopic examination for investigation of compatible cysts to *Sarcocystis* spp. Ten sarcocysts were collected of each sample and processed to DNA extraction followed by PCR for molecular diagnosis of *Sarcocystis* spp. The presence of antibodies against the parasite was tested by IFAT in the blood serum. The frequency of sarcocysts detection by fresh examination was 100% (50/50). Specific antibodies against *Sarcocystis* spp. were detected in 96% (48/50) and 80% (40/50) of serum samples examined at 1:25 and 1:200 dilutions, respectively. DNA from *Sarcocystis* spp. was amplified by PCR in 86% (43/50) of the collected cysts. The methods employed allowed to detect the infection by *Sarcocystis* spp. and RIFI showed good sensitivity compared to fresh microscopic examination. In the study presented in Chapter 3, serological tests (RIFI and *Dot-blot*) of mice inoculated with *Sarcocystis* spp. or *N. caninum* or *T. gondii*. *Dot-Blot* showed same specificity and sensibility as IFAT for immunological diagnostic of *Sarcocystis* spp. in experimentally infected mice and this immunoblot test did not demonstrate serological cross-reactions with *N. caninum* and *T. gondii*.

Key words: Molecular diagnosis. DNA sequencing. Serological tests. Protozoa.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Artigo científico publicado

78

Neospora spp. and *Toxoplasma gondii* infection in sheep flocks from Rio Grande do Sul, Brazil

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura A - Location of the Rio Grande do Sul state, Brazil, is marked (painted in black) in the South America map. The expanded map shows the location of the studied region (Central region) and where other studies on the occurrence of sarcocysts in cattle muscles or meat were performed in Brazil and neighboring country Argentina..... 43

Figura B - Light microscopy of non-stained *Sarcocystis* spp. microcysts isolated from the myocardium of cattle slaughtered in an abattoir located in the Central region of Rio Grande do Sul state, southern Brazil. Notice the thin wall containing some hair-like villar protrusions (black arrows) and the septa dividing the internal compartments (white arrows) in the entire sarcocysts pictures (1, 2) and detailed picture (3). 400x magnification..... 44

Figura C - Agarosis gel after electrophoresis running showing *S. cruzi* DNA restriction pattern resulting from PCR-RFLP using BclI and RsaI enzymes. Column 0: 100bp DNA ladder. Columns 1, 3, 5, 7, and 9: 700bp DNA fragment digested by RsaI (approximately 300 bp and 400 bp fragments). Columns: 2, 4, 6, 8, and 10: 700bp DNA fragment undigested by BclI..... 45

ANEXOS

Figura 1 - Ten studied sheep flocks located in eight counties from Rio Grande do Sul state, southern Brazil. Black spheres depict the location of the farms..... 89

Figura 2 - Distribution and strata (upper, intermediate, lower) of the frequency of *Neospora* spp. seropositive sheep in each farm (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). Different lowercase letters on each column (a, b, c, d, e) indicate significant differences, assessed by the Chi-square test at 95% confidence interval..... 90

Figura 3 - Distribution and strata (upper, intermediate, lower) of the frequency of *Toxoplasma gondii* seropositive sheep in each farm (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). Different lowercase letters on each column (a, b, c, d, e) indicate significant differences, assessed by the Chi-square test at 95% confidence interval..... 90

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Espécies de <i>Sarcocystis</i> que possuem bovinos como hospedeiro intermediário e sua classificação quanto ao tamanho e parede do cisto.....	16
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Sensitivity, specificity and Kappa value, comparing IFAT 1:25 and IFAT 1:200 with direct microscopic examination (gold standard):.....	54
---	----

ANEXOS

Tabela 1 - Frequencies of <i>Neospora</i> spp. and <i>Toxoplasma gondii</i> seropositive sheep and risk factors observed in each studied farm.....	91
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. ETIOLOGIA.....	13
2.2. EPIDEMIOLOGIA	16
2.3. CICLO DE VIDA.....	20
2.4. PATOGENIA.....	21
2.5. SINAIS CLÍNICOS.....	21
2.5.1. Lesões de miosite eosinofílica.....	23
2.5.2. Sinais clínicos em humanos.....	23
2.6. PATOLOGIA.....	23
2.7. DIAGNÓSTICO.....	25
2.7.1. Diagnóstico Direto.....	26
2.7.2. Diagnóstico Indireto.....	28
2.8. CONTROLE E PROFILAXIA.....	30
3. CAPÍTULO I – Artigo científico - <i>Sarcocystis</i> species identification in cattle hearts destined to human consumption in southern Brazil.....	32
4. CAPÍTULO II – Nota científica - <i>Sarcocystis</i> spp. detection in cattle by different diagnostic methods.....	46
5. CAPÍTULO III – Artigo científico – Performance of <i>Dot-blot</i> test for <i>Sarcocystis</i> spp antibodies detection.....	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS - Artigo científico - <i>Neospora</i> spp. and <i>Toxoplasma gondii</i> infection in sheep flocks from Rio Grande do Sul, Brazil.....	78

1. INTRODUÇÃO

Sarcocystis spp. são protozoários que requerem dois hospedeiros para completarem o seu ciclo de vida (FAYER et al., 2015). Essas espécies podem causar distúrbios gastrointestinais nos hospedeiros definitivos (HD), como humanos ou carnívoros, devido à sua presença no trato gastrointestinal (BUCCA et al., 2011; DUBEY et al., 2015b). Os hospedeiros intermediários (HI) são infectados através da ingestão de oocistos liberados nas fezes dos HD (DUBEY & LINDSAY, 2006). Bovinos são considerados hospedeiros intermediários para algumas espécies importantes de *Sarcocystis*, como *S. hirsuta* (felinos como HD); *S. hominis* (primatas e humanos como HD); *S. cruzi* (canídeos como HD); *S. rommeli* (HD atualmente desconhecido); *S. bovini* (gatos como HD); *S. bovifelis* (gatos como HD) e *S. heydorni* (humanos como HD), produzindo macrocistos para as duas primeiras espécies listadas e microcistos em se tratando das outras cinco espécies descritas (MORÉ et al., 2011; HAMIDINEJAT et al., 2015; DUBEY et al., 2015b; GJERDE, 2016 a, b).

Em vários países, incluindo o Brasil, a prevalência de *Sarcocystis* spp. em bovinos é de 90-100% (RUAS et al., 2001; AKHLAGHI et al., 2016; MORÉ et al., 2011). A sarcocistose bovina normalmente se caracteriza com uma doença de caráter crônico, apresentando miosite leve, no entanto, pode causar perdas econômicas severas devido a uma queda na produção de leite, aumento na frequência de abortos, nascimento de bezerros fracos, condenação de carcaça em frigorífico e até mortalidade (FAYER et al., 1983; VANGEEL et al., 2013; HAMIDINEJAT et al., 2015). Geralmente, as lesões macroscópicas não são observadas em animais infectados e o diagnóstico depende do exame microscópico direto de amostras de tecido-alvo, como coração, língua, esôfago e diafragma (DUBEY et al., 2016).

A infecção por sarcocistos microscópicos geralmente é assintomática e esses microcistos não são detectáveis pelas técnicas rotineiramente utilizadas em inspeção da carne em frigoríficos e o mesmo animal pode estar infectado por múltiplas espécies de *Sarcocystis* (LOPES, 2004; MORÉ et al., 2013, 2014), algumas delas não são morfológicamente distinguíveis, exceto através da microscopia de transmissão eletrônica (GJERDE et al., 2016a), mas esta não é aplicável para diagnóstico de uma grande quantidade de amostras. Com isso, a identificação de *Sarcocystis* spp., em carne de bovinos destinadas a consumo humano através de métodos moleculares é essencial no diagnóstico e conseqüentemente no que diz respeito à saúde pública e produção de bovinos (MORÉ et al., 2011; BUCCA et al.,

2011; VANGEEL et al., 2013). Animais subclínicamente infectados comportam-se como portadores do protozoário e devido a isso, o diagnóstico sorológico é indispensável para detecção destes animais no rebanho e aplicação deste teste em um grande número de amostras, a fim de estabelecer medidas de controle na propriedade (ÁLVAREZ-GARCIA et al., 2014; GARCÍA-LUNAR et al., 2015). Vários métodos sorológicos têm sido desenvolvidos, como reação de imunofluorescência indireta, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e *immunoblots*, para diagnóstico de sarcocistose bovina (MORÉ et al., 2008; MORÉ et al., 2011, GARCÍA-LUNAR et al., 2015). Adicionalmente, as técnicas sorológicas detectam anticorpos contra antígenos de *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp. e *T. gondii* em infecções individuais ou mistas (UGGLA et al. 1987; DUBEY et al. 1996).

Portanto, os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar a frequência da infecção por *Sarcocystis* spp. e investigar a ocorrência de *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* em corações de bovinos destinados ao consumo humano na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil; (2) investigar a infecção de bovinos por *Sarcocystis* spp. em amostras de miocárdio pela técnica de exame microscópico direto e confirmar a identidade dos cistos encontrados através de PCR, bem como, avaliar amostras de soro sanguíneo de bovinos pela técnica de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos contra o protozoário e estabelecer uma correlação com os resultados obtidos no exame microscópico direto e PCR; (3) avaliar comparativamente dois métodos sorológicos (imunofluorescência indireta e *Dot-Blot*) para diagnóstico de *Sarcocystis* spp. em camundongos experimentalmente infectados e verificar a possibilidade de reação cruzada com *N. caninum* e *T. gondii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Bovinos podem ser infectados por pelo menos sete espécies de *Sarcocystis*, sendo elas: *Sarcocystis cruzi*, *S. hirsuta*, *S. hominis*, *S. rommeli*, *S. heydorni*, *S. bovini* e *S. bovifelis*. A infecção por qualquer uma destas espécies é potencialmente capaz de causar perdas produtivas em bovinos, incluindo menor produtividade e condenação de carcaça em frigorífico. O diagnóstico da sarcocistose em bovinos é difícil, uma vez que os animais raramente apresentam sinais clínicos e estes, quando presentes são inespecíficos. Visto que, *S. hominis* e *S. heydorni* apresentam risco de zoonose, é importante a realização de inquérito epidemiológico, incluindo a implementação de testes de diagnóstico (THOMPSON, 2013).

2.1. ETIOLOGIA

A sarcocistose foi descrita inicialmente por MIESCHER (1843), tendo sido nomeada como túbulos de Miescher durante 20 anos, na musculatura esquelética de camundongos *Mus musculus*; e o gênero *Sarcocystis* foi discutido pela primeira vez por LANKESTER (1882) em rãs (RUAS et al., 2011; LATIF, 2016). A visualização destes cistos deu origem ao diagnóstico de algumas espécies, com base na sua morfologia e hospedeiro parasitado (GUÇLU, 2004; LOPES et al., 2004). Este gênero apresenta mais de 200 espécies, infectando mamíferos, aves, marsupiais e animais poiquilotérmicos (LATIF, 2016). No entanto, conhecem-se os ciclos de vida completos de apenas 26 dessas espécies (DUBEY, 2015). As espécies de *Sarcocystis* apresentam um ciclo heteroxeno, com a participação obrigatória de pelo menos dois hospedeiros: definitivo e intermediário (GUÇLU, 2004; MORÉ et al., 2013; DUBEY, 2015).

Os cistos de *Sarcocystis* spp. são intramusculares e ovóides (GARDINER et al., 1998) e podem ser classificados em cistos de parede fina e cistos de parede grossa. Das espécies que infectam bovinos (*S. cruzi*, *S. hominis*, *S. hirsuta*, *S. bovifelis*, *S. rommeli*, *S. bovini* e *S. heydorni*), observa-se que os cistos de *S. cruzi* e *S. heydorni* possuem paredes finas (0,5 a 1 μm) e são estruturalmente semelhantes, com base na microscopia óptica. Cistos de *S. cruzi* são microscópicos, com um comprimento de aproximadamente 0,5 mm e apresentam saliências semelhantes a fios de cabelo, longas e estreitas (<0,5 μm) na parede dos cistos e difíceis de serem visualizadas quando observados sob microscopia óptica (GESTRICH et al., 1975 a,b; MEHLHORN et al., 1975 a,b; BOTTNER et al., 1987). Os cistos de *S. heydorni* são microscópicos, com cerca de 1060 μm (1 mm) de comprimento e 80 μm de largura e por

microscopia óptica observa-se a parede do cisto fina (<1 µm de espessura) e com saliências minúsculas. Na microscopia de transmissão eletrônica, a parede apresenta vilosidades cônicas, de 0,5 µm de comprimento e 0,5 µm de largura. As vilosidades na parede do cisto não possuem microtúbulos, mas possuem seis ou mais placas em forma de disco. A estrutura da parede do *S. heydorni* é diferente das demais espécies relatadas de *Sarcocystis* em bovinos e esta é uma espécie nomeada em homenagem ao Dr. Alfred Otto Heydorn (DUBEY et al., 2015b) (Tabela 1).

Primeiramente, *S. heydorni* foi descrito como sendo *S. hominis*, quando o Dr. Heydorn se alimentou com carne bovina crua em uma viagem realizada à Turquia em 1973, após, em 1983 inoculou cinco bovinos recém-nascidos com esporocistos, das suas próprias fezes. Durante alguns anos ele manteve este ciclo entre humano e bovino (DUBEY et al. 1988b). Recentemente, todos os cortes histológicos de tecidos dos cinco bezerros inoculados corados com hematoxilina e eosina (H e E) e um bloco de parafina da língua de um dos bezerros que foi eutanasiado no dia 222 após a inoculação (p.i.) foram localizados. O bloco de parafina da língua foi desparafinado e processado para microscopia de transmissão eletrônica (DUBEY et al., 2015b). Todas as secções coradas com H e E a partir dos cinco bezerros foram reexaminadas, incluindo secções de coração, esôfago e músculo esquelético. Dois tipos de *Sarcocystis* (paredes fina e grossa) foram encontrados em bezerros que foram eutanasiados aos 111 dias p.i. e 222 dias p.i. e a maioria dos *Sarcocystis* encontrados eram de parede grossa. O esôfago foi o tecido mais infectado, por *S. hominis*. Cinco espécies de *Sarcocystis* foram encontrados no bloco de parafina da língua do animal que foi eutanasiado aos 222 dias p.i. após desparafinização e análise por microscopia eletrônica de transmissão. Três dos cinco *Sarcocystis* encontrados exibiam parede grossa (incluindo *S. hominis*) e dois deles apresentavam parede fina, que posteriormente, pela observação das características da parede do cisto, foi nomeado como *S. heydorni* (DUBEY et al., 2015b).

S. hirsuta, *S. rommeli*, *S. bovis*, *S. bovini* e *S. hominis* são cistos de parede espessa (4 a 6 µm) e também são de difícil diferenciação quando visualizados pela microscopia óptica (SCANZIANI et al., 1988; DUBEY et al., 1989a; GJERDE, 2016a). Estas espécies podem ser distinguidas através de transmissão eletrônica, por meio da diferenciação das estruturas microscópicas da parede dos cistos (BOTTFNER et al., 1987; GHISLENI, 2006; DUBEY, 2015). As protuberâncias ou saliências das vilosidades de *S. hominis* são cilíndricas, orientadas perpendicularmente à superfície e contêm relativamente poucos grânulos densos (MEHLHORN et al., 1975 b; DUBEY et al., 1988b). Os cistos de *S. hirsuta* podem ter entre 2

a 7 mm de comprimento e 1 mm de largura, e apresentam vilosidades de 8 µm de comprimento com saliências de haste estreita, orientadas lateralmente, contendo grânulos densos (DUBEY et al., 1990). Já os cistos de *S. bovifelis* possuem protrusões, com numerosos microtúbulos (200-300 fibrilas) e as protrusões são inclinadas, dobradas em ângulo acima de suas bases (GESTRICH et al. 1975b; MEHLHORN et al. 1975c; MEHLHORN et al. 1976). Além disso, em torno das bases das protrusões existem numerosas áreas semelhantes a vesículas acima de uma substância mais eletrodensa (GESTRICH et al. 1975b; MEHLHORN et al. 1975c; MEHLHORN et al. 1976). Outra característica importante é que, enquanto as protrusões de *S. hominis* são arredondadas desde a sua base até a ponta, protrusões de *S. bovifelis* são arredondadas somente próximas às suas bases e depois são em forma de diamante ou fuso (fusiformes) em direção à ponta (GJERDE, 2016a). *S. bovifelis* havia sido erroneamente descrito e nomeado como *S. hirsuta* (GESTRICH et al., 1975b) e posteriormente foi elucidado que ambos possuem felinos como hospedeiros definitivos (DUBEY et al. 1989a, c), porém, *S. hirsuta* forma cistos macroscópicos e *S. bovifelis* cistos microscópicos (GJERDE et al. 2016 a). *S. bovini* apresenta cistos microscópicos, finos e em forma de fuso, com 1-3 mm de comprimento e 0,1-0,2 mm de diâmetro. A parede é radialmente estriada e possui protrusões longas de 5-6 µm em formas de dedos. Por microscopia óptica são indistinguíveis de *S. bovifelis* (CHEN, et al, 2011; GJERDE et al, 2016b). Os cistos de *S. rommeli* possuem parede de 4,5 a 5,2 µm de comprimento e vilosidades alongadas e onduladas, muitas vezes dobradas em ângulo, com 5 µm de comprimento e largura desigual, contendo microtúbulos sem grânulos, que se prolongam a partir da ponta para o meio da substância da base, apresentando fileiras de vesículas na base das vilosidades (DUBEY et al., 2015a) (Tabela 1).

Cistos de *Sarcocystis* spp. geralmente são encontrados no coração, língua, esôfago e diafragma, porém, também podem ser encontrados em outros músculos, com prevalências variáveis (SAITO et al, 1998; ONO & OHSUMI, 1999; BUCCA et al., 2011). Cistos de *S. cruzi* são encontrados em praticamente todos os músculos estriados, fibras de Purkinje do coração e no sistema nervoso central (SNC) (XIANG et al., 2011). O local de predileção para *S. cruzi* é o miocárdio, enquanto que, *S. heydorni* não é encontrado no coração (DUBEY et al., 2015b). Os cistos de *S. hirsuta* e *S. hominis* são mais numerosos no diafragma, membros, lombo e esôfago (DUBEY et al., 1990).

Tabela 1 – Espécies de *Sarcocystis* que possuem bovinos como hospedeiro intermediário e sua classificação quanto ao tamanho e parede do cisto.

Espécie	Cistos	Parede do cisto
<i>S. hirsuta</i>	Macroscópico*	Espessa**
<i>S. hominis</i>	Macroscópico*	Espessa**
<i>S. bovini</i>	Microscópico*	Espessa**
<i>S. bovifelis</i>	Microscópico*	Espessa**
<i>S. rommeli</i>	Microscópico*	Espessa**
<i>S. heydorni</i>	Microscópico*	Fina**
<i>S. cruzi</i>	Microscópico*	Fina**

Fonte: próprio autor

*Macroscópico >3 mm; Microscópico = 0,5 a 3 mm.

** Parede espessa 4 a 6 µm; Parede fina = 0,5 a 1 µm.

2.2. EPIDEMIOLOGIA

A prevalência de *Sarcocystis* nos bovinos é próxima de 100% na maioria das regiões estudadas ao redor do mundo (VANGEEL et al., 2013; AMAIRIA et al., 2016; NG et al., 2015). Muitas condições podem permitir a elevada prevalência: um hospedeiro intermediário muitas vezes pode abrigar mais de uma espécie de *Sarcocystis*; muitos hospedeiros definitivos estão envolvidos na transmissão do parasito; um grande número de oocistos pode ser excretado; oocistos e esporocistos de *Sarcocystis* desenvolvem-se na lâmina própria do intestino e são excretados por vários meses; oocistos são resistentes ao congelamento e podem sobreviver por muito tempo na pastagem, ou podem também ser disseminados através do transporte por invertebrados; existe pouca ou nenhuma imunidade para nova infecção tanto em hospedeiros intermediários como definitivos, e a cada ingestão de carne infectada pode iniciar um novo estágio de produção de esporocistos; a frequência com que os cães são alimentados com vísceras e órgãos de bovinos abatidos nas propriedades rurais, ou pelo consumo de carcaças de bovinos mortos é alta (DUBEY & LINDSAY, 2006; RUAS et al., 2011).

Animais mais velhos geralmente estão associados com uma maior prevalência da infecção por *Sarcocystis* spp. (ONO & OHSUMI, 1999; GHISLENI et al., 2006) e esta alta proporção em animais adultos sugere que a prevalência da sarcocistose aumente com a idade,

talvez devido ao maior tempo ao longo da vida do animal ingerindo oocistos ou devido à imunidade insuficiente, uma vez que os animais não se tornam resistentes a uma nova fase aguda da infecção, pois está relacionada à dose infectante e ao desenvolvimento das fases merogônicas, possibilitando reinfecção (LOPES, 2004).

Além disso, em bovinos adultos os cistos parecem ser maiores que os encontrados em bovinos jovens, indicando crescimento contínuo dos cistos ao longo do tempo (MOREÉ et al. 2008). Fatores de risco também podem estar relacionados à presença de carnívoros próxima às instalações de bovinos, inclusive sobre o uso destes no manejo dos bovinos, principalmente quando se refere ao cão sendo considerado HD das espécies mais patogênicas para animais de produção (BONESI et al., 1999; RUAS et al, 2011; AIMARIA et al., 2016). Não se pode descartar também a presença de outros carnívoros silvestres, entre eles o cachorro do mato (PEREIRA & LOPES, 1982) e o gato, podendo ser responsáveis pela eliminação e dispersão dos oocistos em diferentes sistemas de produção existentes no Brasil. Experimentalmente, já foi observado que a transfusão sanguínea pode transmitir merozoítos circulantes de um animal para outro, viabilizando o processo de infecção e a formação de cistos viáveis na musculatura de animais receptores da mesma espécie (FAYER & LEEK, 1979; LOPES, 2004).

A globalização é um dos fatores que favorecem a propagação de doenças infecciosas, incluindo parasitos de origem alimentar, como *Sarcocystis* spp. e isso pode ter um enorme impacto negativo em se tratando de segurança alimentar. A maior variedade e quantidade de itens que são enviados para mais lugares associado ao maior número de pessoas que viajam cada vez mais a grandes distâncias, possibilita a exposição de uma nova população humana e animal à infecção com patógenos de origem alimentar. Ademais, embora certos países sejam muito restritivos quanto à importação de bovinos, é cada vez mais frequente que cães sejam importados para adoção, além de que, o movimento ilegal e não regulamentado de animais de companhia tem aumentado; assim como também animais selvagens são capturados ou criados e enviados a vários países, para serem vendidos como animais de estimação, ou ainda são transportados para alimentação ou reintrodução de espécies locais extintas, como em zoológicos. Portanto, a introdução de bovinos, animais de companhia, animais aquáticos, e de vida selvagem em novas áreas, podem carrear parasitos para novos locais que antes seriam considerados exóticos ou ainda, causar uma reintrodução de parasitos em áreas endêmicas, apesar das regulamentações ou diretrizes internacionais usadas para minimizar esses riscos. Quanto à exportação e importação de alimentos, existem diferenças internacionais em saneamento, higiene, práticas agrícolas, diferenças no clima e também de agentes

patogênicos, o que significa que essas grandes quantidades de alimentos enviados ao redor do mundo estão sujeitas a diversos regulamentos de países exportadores e importadores e, desta forma, é essencial para a segurança alimentar a conformidade e verificação desses controles (ROBERTSON et al., 2014).

Dos 24 parasitos de origem alimentar de maior relevância, cinco são associados ao consumo de carne crua ou mal cozida infectada com: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii*, e *Sarcocystis* spp. (ROBERTSON et al., 2014). Os hábitos alimentares, incluindo os tipos de alimentos ingeridos e métodos de preparação, são também uns dos exemplos do comportamento humano que podem desempenhar um papel central na emergência ou reemergência de parasitos zoonóticos (MACPHERSON, 2005). A falta de consciência da forma de transmissão destas doenças parasitárias, a incapacidade de reconhecer os sinais clínicos que são semelhantes a muitas doenças e deficiências em ferramentas de diagnóstico complica e atrasa o diagnóstico e tratamento, quando este é possível (ROBERTSON, et al., 2014).

Nos países europeus, onde a frequência do consumo de carne crua ou mal cozida é relativamente alta, os humanos são susceptíveis a desenvolverem sarcocistose intestinal (DUBEY & LINDSAY, 2006). Em um estudo realizado com hambúrgueres de carne bovina a fim de investigar a presença de tecido cerebral devido à preocupação com a encefalopatia espongiiforme bovina, foi observada a presença de *Sarcocystis* em duas marcas de hambúrgueres. A morfologia dos organismos era consistente com *Sarcocystis*, evidenciando assim, que a presença deste protozoário na carne bovina pode representar uma fonte de infecção para seres humanos, caso estes sejam identificados como sendo *Sarcocystis* zoonóticos (*S. hominis* e *S. heydorni*) e não sejam adotadas medidas de controle, como por exemplo, o cozimento adequado da carne (PRAYSON et al., 2008).

S. cruzi é a espécie mais prevalente de *Sarcocystis* que infectam bovinos e em muitos países, cerca de 90% do rebanho bovino adulto, pode estar infectado, sendo o coração o tecido mais afetado (MORÉ et al., 2011; RUAS et al., 2011). A maior detecção de *Sarcocystis* no coração em relação a outros órgãos, relatada por muitos autores, se deve ao fato da infecção ocorrer por via digestiva, onde o parasito atinge a circulação geral, alcançando por via venosa, primeiro o coração, e assim alojando e encistando-se no miocárdio (PEZZAT, 1971; DUBEY et al., 1989a; RUAS et al., 2001). A prevalência de *S. hirsuta* e *S. hominis* é variável em bovinos em diferentes partes do mundo, sendo o esôfago e outros músculos, mas não o coração, os mais afetados (MORÉ et al., 2011). *S. hominis* causa perdas econômicas substanciais na pecuária bovina e é um grave patógeno intestinal de humanos no sul da China

(ZUO, 1992). A distribuição de *S. heydorni* ainda permanece desconhecida, pois foi recentemente identificado como sendo uma espécie diferente do que havia sido identificado como *S. hominis* (DUBEY et al., 2015b). *S. bovini* têm sido encontrado em bovinos da Argentina e Nova Zelândia, assim como comparações de sequências genéticas depositadas no GenBank sugerem que esta espécie também possa ocorrer em bovinos na China (GJERDE et al., 2016b). *S. rommeli* possui distribuição pela Europa e Argentina (DUBEY et al., 2015a).

Pode haver infecção mista por mais de um *Sarcocystis* em bovinos, conforme demonstrado por DUBEY et al. (2015b) em língua de um bovino experimentalmente infectado, bem como observado por GHISLENI et al. (2006), em amostras analisadas de carne enlatada de bovinos da Argentina e Brasil, apresentando cistos de parede fina identificados como *S. cruzi* em maior prevalência, mas também cistos de parede grossa (*S. hominis* ou *S. hirsuta*) e também notado por RUAS et al. (2011) em que foram detectados cistos de *S. cruzi* no miocárdio e cistos de *S. hirsuta* no diafragma de bovinos naturalmente infectados no Rio Grande do Sul. Os dados a respeito da prevalência de *Sarcocystis* spp. no Brasil são escassos (GHISLENI, 2006). Levando em consideração a prevalência relatada de *S. cruzi* em vários países, a maioria da carne consumida de bovinos encontra-se infectada com este parasito (BÖTNER et al., 1987; VERCRUYSSSE et al., 1989; WOLDMESKEL & GEBREAB, 1996; FUKUYO et al., 2002; MORÉ et al., 2008). No Rio Grande do Sul, existem estudos indicando a presença do protozoário em 100% dos animais estudados (RUAS et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Um pré-requisito para obtenção de informações precisas sobre dados epidemiológicos das infecções por *Sarcocystis* é a disponibilidade de testes diagnósticos específicos e sensíveis que podem ser usados para diferenciar animais infectados de não infectados. Vários estudos epidemiológicos de infecções em hospedeiros intermediários têm sido levados em consideração através de digestão enzimática e microscopia dos músculos mais acometidos (TENTER, 1995). No entanto, o método de digestão em que as paredes do cisto são digeridas, não permite a posterior diferenciação de espécies de *Sarcocystis* spp. Além disso, mesmo totalmente íntegros alguns cistos de *Sarcocystis* spp. não podem ser distinguidos na microscopia óptica, uma vez que são muito semelhantes morfológicamente (DUBEY et al., 1989b; TENTER et al; 1995). Com isso, técnicas moleculares podem ser uma alternativa no diagnóstico de infecções parasitárias, pois permitem a detecção e diferenciação das espécies patogênicas, além de realização de estudos epidemiológicos, tanto em hospedeiros intermediários como definitivos. A detecção de DNA em bovinos pode ser feita em amostras

de tecidos de fetos abortados, placentas ou órgãos internos após a morte do animal. Porém, para estudos epidemiológicos, no hospedeiro intermediário, seria interessante a análise de amostras de sangue, a fim de possibilitar a avaliação de uma grande quantidade de amostras (TENTER, 1995).

2.3. CICLO DE VIDA

Os parasitos do gênero *Sarcocystis* possuem um ciclo de vida heteroxeno, com um estágio assexuado nos hospedeiros intermediários e um estágio sexuado nos hospedeiros definitivos. Os caninos são hospedeiros definitivos para *S. cruzi*, os felinos são hospedeiros definitivos para *S. hirsuta*, *S. bovini* e *S. bovifelis*, bem como os humanos são hospedeiros definitivos para *S. hominis* e *S. heydorni* (XIANG et al., 2011; GJERDE et al., 2016b). O hospedeiro definitivo para *S. rommeli* permanece desconhecido até o presente momento (DUBEY et al., 2015a). Os hospedeiros definitivos, carnívoros e homem, se infectam pela ingestão de formas encistadas presentes na musculatura de herbívoros e o parasito desenvolve uma fase intestinal que culmina com a produção de oocistos, contendo no seu interior dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada (GUÇLU, 2004). Nos hospedeiros intermediários, a infecção por *Sarcocystis* spp. leva à formação de cistos nos tecidos, que quando maduros, apresentam um grande número de bradizoítos no seu interior (DUBEY, 1989a; RUAS et al., 2001).

A transmissão vertical de *S. cruzi* em bovinos não é muito comum, mas a transmissão horizontal parece ser considerada a rota mais importante da infecção para o HI (MOREÉ et al., 2009). Em geral, o HI é infectado pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos e inicia o ciclo assexuado. Os esporozoítos dentro dos esporocistos se rompem no intestino delgado e o núcleo dos esporozoítos se divide em muitos núcleos, formando merozoítos, assim os esquizontes de primeira geração são formados, 7 a 15 dias após a ingestão. Esta fase de núcleos multilobulados é chamada de esquizonte. Os esquizontes são formados em uma variedade de células, incluindo células endoteliais vasculares, células somáticas, e células neuronais, dependendo da espécie de *Sarcocystis*. Após alguns ciclos de esquizontes, o parasito se encista, sendo denominado cisto (ou sarcocisto), habitualmente em um miócito, dando origem aos bradizoítos (ou cistozoítos), que possuem formato de banana. Os cistos se localizam principalmente em músculos estriados, SNC e fibras de Purkinje no coração (TENTER, 1995). Durante a formação e a maturação o cisto pode demorar um mês

ou mais para se tornar infeccioso ao hospedeiro definitivo (DUBEY, 2015). Os sarcocistos imaturos, contendo apenas merozoítos, não são infecciosos para o hospedeiro definitivo.

O HD é então infectado ingerindo tecidos contendo cistos com bradizoítos (cistos maduros). Os bradizoítos são liberados do cisto no estômago através da digestão e penetram na mucosa do intestino delgado, transformando-se em gametas fêmeas (macrogametas) e machos (microgametas). Após a fecundação de um macrogameta por um microgameta, uma parede se desenvolve em torno do zigoto e um oocisto é formado. Todo o processo de fertilização e gametogonia ocorrem dentro de 24 horas. A gametogonia acontece na lâmina própria do intestino delgado, portanto, os oocistos esporulam *in situ*, levando à formação de oocistos esporulados, geralmente dentro de uma semana depois da ingestão de bradizoítos. A parede do oocisto é muito fina e se rompe durante a excreção, liberando os esporocistos para o lúmen intestinal e os esporocistos podem ser encontrados livres nas fezes (DUBEY, 2015). A maioria dos oocistos das espécies de *Sarcocystis* é excretada nas fezes 7 a 14 dias após a ingestão de cistos pelo hospedeiro definitivo. Pelo fato dos oocistos estarem na lâmina própria, sua liberação para o lúmen intestinal e fezes perdura por vários meses. Nem todas as espécies de *Sarcocystis* causam doença clínica em suas espécies hospedeiras (ROBERTSON et al, 2001; DUBEY & LINDSAY, 2006; DUBEY, 2015).

2.4. PATOGENIA

A maior importância está relacionada aos HI, pois há distribuição do parasito por todo o sistema sanguíneo. Esquizontes de diversas gerações, ao se desenvolverem na íntima das artérias e capilares viscerais são responsáveis por obliteração do fluxo sanguíneo, em razão do aumento de sua forma dentro da luz vascular ou por ocasionarem lesões vasculares devido ao seu rompimento para liberação dos merozoítos. Conseqüentemente, sucede-se uma extensa reação semelhante à coagulação intravascular disseminada, pela agregação de plaquetas e concomitante formação de trombos. Neste período, é observado uma anemia macrocítica e aumento progressivo dos níveis de fibrinogênio entre 1 a 8 semanas após a infecção (BOTELHO & LOPES, 1988 a, b). Quanto à formação e desenvolvimento dos cistos, se observam alterações em enzimas como aspartato aminotransferase (AST), isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH) (LOPES, 2004).

2.6 SINAIS CLÍNICOS

Os bovinos são considerados hospedeiros intermediários para *Sarcocystis* spp. e a maioria das infecções se apresenta de forma crônica (MORÉ et al., 2013). A forma crônica está relacionada com a fase de encistamento do protozoário, que ocorre quando a imunidade toma lugar, enquanto que, quando ocorre manifestação da forma aguda, está relacionada ao desenvolvimento do parasito intravascularmente (SILVA et al., 2002).

Geralmente, as espécies que utilizam canídeos como hospedeiros definitivos são mais patogênicas para os bovinos (hospedeiros intermediários) do que as que utilizam felídeos (TENTER, 1995). Por exemplo, das três espécies mais encontradas em bovinos, *S. cruzi* é o mais patogênico, em que o cão é o hospedeiro definitivo, enquanto que *S. hirsuta* e *S. hominis*, os quais sofrem reprodução sexuada em gatos e primatas, respectivamente, são moderadamente patogênicos. A patogenicidade manifesta-se no hospedeiro intermediário e rotineiramente não causa doença em hospedeiros definitivos (DUBEY & LINDSAY, 2006). A severidade dos sinais clínicos depende da espécie hospedeira, da dose infectante de oocistos ingerido, da localização do parasito e do *status* imunitário do hospedeiro intermediário (LINDSAY et al. 1995; ZOLL, et al., 2015). Os sinais clínicos durante a fase de merogonia nas células endoteliais dos órgãos acometidos são mais severos que durante a fase de formação e desenvolvimento de cistos nos músculos e SNC (TENTER, 1995). A ingestão de uma grande quantidade de oocistos de *S. cruzi* pode levar a sarcocistose aguda em bovinos ainda não infectados ou provocar uma reinfecção em animais infectados. Embora os bovinos apresentem cistos na musculatura estriada originários de uma infecção prévia e muitas vezes sem sinais clínicos, este fato não os torna resistentes a uma nova fase aguda da infecção, pois esta está relacionada à dose infectante e ao desenvolvimento das fases merogônicas (TENTER, 1995; LOPES, 2004).

Apesar de a sarcocistose representar, na maioria dos casos, um achado microscópico em bovinos, a infecção por *S. cruzi* pode ser acompanhada de sinais clínicos e determina baixa performance durante a fase aguda de infecção (DAUGSCHIES et al., 2000), podendo estar associada ao aumento do risco de aborto e, raramente, encefalite ou miosite (PRAYSON et al., 2008). Os sinais clínicos são geralmente observados durante o segundo ciclo de esquizogonia nos vasos sanguíneos (fase aguda). Três a quatro semanas após infecção com alta dose de oocistos (50.000 ou mais), ocorre o desenvolvimento de febre, anorexia, prostração, anemia, secreção nasal e ocular, dispneia, salivação, opistótono, emaciação e queda de pelos (particularmente, perda da vassoura da cauda) e em alguns casos, pode levar a morte (LOPES, 2004). Também podem ser observados, tanto em fêmeas jovens como adultas,

queda na produção leiteira, casos de abortos, retenção de placenta; morte fetal; nascimento de animais fracos e prematuros (FAYER et al., 1983; LOPES, 2004; AIMARIA et al., 2016).

2.5.1 Lesões de miosite eosinofílica bovina

Em bovinos, a infecção por *Sarcocystis* pode estar associada com miosite eosinofílica (WOUDA et al., 2006). Nestes casos, uma miopatia inflamatória específica caracterizada por lesões cinza-esverdeada multifocais em músculo estriado de bovinos pode ser encontrada e é mais comum encontrar cistos de *S. hominis* (VANGEEL et al., 2013), mas não se descarta a possibilidade de estar presente outras espécies de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 1990). Histologicamente, as lesões consistem de uma inflamação eosinofílica com degeneração da fibra muscular e no centro das lesões é possível encontrar *Sarcocystis* associados com a presença de granulócitos eosinofílicos, devido a resposta imunitária frente aos antígenos do parasito (VANGEEL et al., 2012). Os animais afetados aparentam ser clinicamente normais, mas a miosite eosinofílica resulta em perdas econômicas devido à condenação da carne em razão da sua aparência anormal, ao abate (IMES & MIGAKI, 1967). Foi relatada a condenação da carne, devido à presença de cistos de *S. hirsuta* (DUBEY et al., 1990). A alta condenação de carcaças associadas com a miosite eosinofílica bovina, de até 5%, foi relatada na parte ocidental dos EUA (JENSEN et al., 1986), porém, a prevalência de miosite eosinofílica é muito baixa em relação à prevalência de *Sarcocystis* em bovinos, que é muito alta (VANGEEL, et al., 2013).

2.5.2. Sinais clínicos em humanos

De todos os mamíferos, aves e animais poiquilotérmicos que podem se infectar com *Sarcocystis* spp., somente os bovinos e suínos são hospedeiros intermediários confirmados das espécies zoonóticas de *Sarcocystis* (DUBEY, 2015). Das espécies de *Sarcocystis* que infectam bovinos somente *S. hominis* e *S. heydorni* (DUBEY et al., 2015a; DUBEY et al., 2015b) possuem potencial zoonótico (DUBEY, 2015). Em humanos (HD), a infecção através da ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo cistos de *S. hominis* ou *S. heydorni* (carne bovina) ou *S. suihominis* (carne suína) (KIEHU, et al., 2017) podendo resultar em sarcocistose intestinal caracterizada por desconforto abdominal, diarreia, vômito, dor de estômago, anemia, tontura, fadiga e eventualmente em inflamação, hemorragia e necrose do intestino (BUNYARATVEJ & UNPUNYO, 1992; FAYER, 2004; PRAKAS & BUTKAUSKAS, 2012; AIMARIA et al., 2016).

A infecção por *Sarcocystis* em humanos foi confirmada por LIAN et al. (1990), onde dois macacos e um humano, voluntário, foram alimentados com carne bovina infectada e excretaram oocistos de *S. hominis* nas fezes (DUBEY et al., 2014). Outro exemplo de infecção por *S. hominis* em humanos foi confirmada através de voluntários que ingeriram carne bovina ou suína crua, infectadas com *Sarcocystis* e que após oito dias ou mais de infecção iniciaram a fase de excreção de oocistos. Alguns deles tornaram-se doentes, dependendo do tipo de carne (bovina ou suína) ingerida e da quantidade de *Sarcocystis* presentes na carne ingerida. As pessoas que comeram carne suína apresentaram sinais clínicos mais graves que àquelas que se alimentaram de carne bovina. Diarreia e dor abdominal foram os sinais clínicos mais consistentes, exibidos dentro de três dias após a ingestão da carne crua, seguidos de excreção de esporocistos (DUBEY, 2015). Muitos voluntários são autores dos próprios trabalhos, como o Dr. Heydorn, após se alimentar tanto com carne bovina e suína, infectadas com *Sarcocystis*, começou a registrar as excreções de oocistos em suas fezes, servindo também como fonte de infecção para infecções experimentais em bovinos e suínos. Por muitos anos, ele manteve os ciclos bovino-humano e suíno-humano em seu laboratório. Os esporocistos foram detectados nas fezes após a ingestão de cada refeição infectada, independentemente da carne ingerida ser de bovino ou suíno (HEYDORN, 1977; DUBEY, 2015).

Em outro estudo, realizado por PENA et al. (2001), 50 amostras de quibe cru de 25 restaurantes árabes na cidade de São Paulo, Brasil, foram examinadas para a presença de sarcocistos usando microscopia óptica e de transmissão eletrônica. *S. hominis* foram encontrados em 94% das amostras. Posteriormente, diferentes amostras de quibe cru, positivas para *S. hominis* foram oferecidas para voluntários humanos e foram observados que seis deles (85,7%) desenvolveram diarreia e excretaram oocistos em suas fezes.

Outra forma de manifestação clínica da infecção por *Sarcocystis* em humanos é a sarcocistose muscular, que ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados com esporocistos de *S. nesbitti*, sendo humanos considerados os hospedeiros intermediários para esta espécie e répteis sendo os hospedeiros definitivos. Os sinais clínicos desta infecção em humanos apresentam-se com: febre, dor de cabeça e mialgia. O subsequente desenvolvimento dos cistos é caracterizado por miosite (FAYER et al., 2015).

2.6. PATOLOGIA

Na necropsia de bovinos infectados, nota-se aumento generalizado dos linfonodos, petéquias no subcutâneo, serosas da cavidade torácica e abdominal, hemorragia subpleural e subpericárdica e bem pronunciada na musculatura intercostal, aumento de fluido avermelhado nas cavidades pericárdica, torácica e abdominal; áreas claras de aspecto multifocal, podendo ser mais extensas com aspecto marmóreo, acentuando-se mais na musculatura dos glúteos (LOPES, 2004). Encefalite com hemorragias e gliose focal pode ser encontrada em alguns casos (TENTER, et al., 1995).

Microscopicamente podem ser observadas anormalidades em linfonodos, músculo esquelético, cardíaco, pulmão, fígado, rins e cérebro. Associadas às lesões, podem ser visualizadas as fases merogônicas (esquizontes) predominantemente no cérebro, língua, coração e rins. No entanto, os esquizontes de *Sarcocystis* spp. podem desaparecer no momento em que o animal morre (DUBEY et al, 1989a; UGGLA & BUXTON, 1990). Degeneração das fibras musculares é observada na musculatura esquelética, variando de intensidade em diferentes locais, onde se visualiza edema, hemorragia e infiltração de células mononucleares, caracterizadas por linfócitos e macrófagos em todos os órgãos (CARRIGAN, 1986; LOPES, 2004). Em casos de aborto, induzido por *Sarcocystis*, os esquizontes podem estar associados com hemorragias e necrose focal nos placentomas (UGGLA & BUXTON, 1990; TENTER, 1995).

2.7. DIAGNÓSTICO

A sarcocistose é uma das causas de redução na produtividade de um rebanho bovino e desta forma, os métodos de diagnóstico são essenciais para a detecção de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 1982).

O diagnóstico histológico pode ser realizado por diferentes técnicas, como método de digestão, exame direto do tecido fresco por microscopia óptica, fixação de tecido por compressão corado com azul de metileno e outras técnicas histológicas que permitem a visualização de cistos de *Sarcocystis* (NG et al., 2015). No entanto, a visualização do parasito em material histológico não necessariamente estabelece que *Sarcocystis* spp. seja a causa da doença, pois o parasito pode permanecer nos tecidos por muitos anos, mas não estar causando sinais clínicos naquele momento (SAVINI et al., 1997), além de serem técnicas laboriosas e dispenderem de bastante tempo para sua execução, portanto, não possuem boa aplicabilidade

no diagnóstico de rotina em abatedouros e laboratórios, onde um grande número de amostras precisa ser avaliado (GARCIA et al., 2008; NG, et al., 2015).

Testes sorológicos e immunoblot podem servir como exames de triagem permitindo a detecção de anticorpos e proteínas, a fim de facilitar o diagnóstico da infecção por *Sarcocystis* (HOMDAHL et al., 1993; GUÇLU, 2004). A aplicação destes métodos é auxiliar no diagnóstico da sarcocistose, pois os sinais clínicos, quando presentes, são inespecíficos e, além disso, a infecção nem sempre causa lesões macroscópicas visíveis durante a inspeção da carne após o abate do animal (BLAGOJEVICK et al., 2014). Os testes sorológicos também possibilitam o diagnóstico de outros toxopasmátíneos, como *N. caninum* e *T. gondii*, em infecções individuais ou mistas (MORÉ et al., 2008; DUBEY et al. 1996).

Além da alta prevalência de taxas de infecção por *Sarcocystis* spp., a presença de cistos de *S. hominis* na carne podem causar condenação da carne (considerando o seu potencial zoonótico) e lesões de miosite, e, por isso, ferramentas específicas que permitem uma identificação confiável de *Sarcocystis* spp., principalmente a diferenciação entre as espécies, são necessárias (BUCCA et al., 2011). Neste sentido, os métodos moleculares, incluindo PCR-RFLP e sequenciamento de DNA, podem ser úteis (MACPHERSON & GAJADHAR, 1994; MORÉ et al., 2011). A identificação entre as espécies pode auxiliar a estimar a prevalência, distribuição, fonte de infecção e fatores de risco associados a estas infecções (MORÉ et al., 2013).

2.7.1. Diagnóstico Direto

Vários métodos são frequentemente usados para detectar *Sarcocystis* diretamente no tecido, incluindo inspeção macroscópica, exame direto do tecido e técnica de digestão histológica com pepsina (DUBEY et al., 1989a). O método convencional para distinguir as diferentes espécies de *Sarcocystis* é a observação da estrutura da parede do cisto sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão e combinando esses dados com informações a respeito do ciclo de vida, como por exemplo, a espécie hospedeira envolvida no ciclo de transmissão. Contudo, estes métodos não são adequados para rotina de identificação entre os *Sarcocystis*, que mostram muito pouca variação morfológica (*S. hirsuta* e *S. hominis*) ou para estudos de um grande número de amostras (YANG et al., 2002; MORÉ et al., 2011; AKHLAGHI et al., 2016).

A inspeção da carne, apesar de ser uma técnica relativamente rápida e barata, é considerada uma técnica pouco sensível, pois somente as espécies de *Sarcocystis* macroscópicas podem ser visualizadas (NG et al., 2015). A digestão do tecido muscular com pepsina e subsequente exame por microscopia óptica também tem sido utilizada para detectar bradizoítos e/ou merozoítos. No entanto, o método de digestão é bastante laborioso e requer bastante tempo para sua execução, portanto, não possui boa aplicabilidade para diagnóstico de um rebanho (GARCIA et al., 2008; NG et al., 2015). O exame do tecido fresco permite a diferenciação entre cistos de parede grossa ($\geq 3\mu\text{m}$) e de parede fina ($\leq 1\mu\text{m}$), mas não permite a diferenciação entre os cistos que possuem parede grossa. A sensibilidade do exame histopatológico é baixa em relação ao exame a fresco, pois um pequeno número de amostra pode ser processado para avaliação de uma pequena secção do tecido, portanto não é um método adequado para a identificação de rotina de *Sarcocystis*, ou para estudos de uma grande quantidade de amostras (DUBEY et al., 1989b; MORÉ et al., 2011).

A detecção molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) melhorou a eficiência de diagnóstico direto de *Sarcocystis* e permitiu a identificação precisa entre espécies (YANG & ZUO, 2000). Técnicas moleculares que auxiliam a diferenciação entre cistos teciduais no hospedeiro intermediário, incluem o PCR-RFLP e sequenciamento de DNA, que podem facilitar os métodos de diagnóstico de *Sarcocystis* (XIANG et al., 2009; AKHLAGHI et al., 2016). O alvo de diagnóstico molecular e de diferenciação entre as espécies de *Sarcocystis* mais comum é a região codificadora da pequena subunidade do gene do RNA ribossomal (18S rDNA), que é repetitiva e demonstra ter variabilidade considerável entre as espécies de *Sarcocystis* (MORÉ et al., 2013). Este gene tem sido apropriado para discriminação entre espécies mais distantes, porém, nem tanto para identificação de espécies estreitamente relacionadas. Mais recentemente têm sido utilizado a PCR a partir do gene mitocondrial, *cox1*, que permite a caracterização genotípica entre as espécies de *Sarcocystis* (GUÇLU, 2004; GJERDE, 2013). Assim, sequências da *cox1* parecem ser melhores que o gene 18S RNA para delimitação de espécies estreitamente relacionadas. Muitos *Sarcocystis* spp. relacionados podem possuir características morfológicas semelhantes, difíceis de serem distinguidas por microscopia eletrônica e desta forma, a identificação de espécies a partir de métodos moleculares, como PCR-RFLP e sequenciamento, podem ser úteis e serem consideradas técnicas mais fáceis de serem executadas para diferenciação entre as espécies estreitamente relacionadas que infectam diferentes hospedeiros intermediários.

2.7.2. Diagnóstico Indireto

Uma combinação de medidas, como inspeção clínica e avaliação sorológica, são necessárias para detectar a infecção crônica e aguda em animais, que apresentem ou não, sinais clínicos da doença (GARCÍA-LUNAR et al., 2015) sem a necessidade de realizar o diagnóstico somente após a morte do animal, pela visualização de cistos teciduais. O diagnóstico clínico de sarcocistose não é simples, pois os sinais clínicos, quando presentes, são inespecíficos (NDIRITU, et al., 1996).

Técnicas sorológicas podem garantir o sucesso no controle da doença, pois a parasitemia para detecção direta do parasito através de exames diretos, geralmente é baixa e persiste por um pequeno intervalo de tempo, durante o desenvolvimento do parasito. Além do que, exames histológicos permitem que apenas uma pequena secção do tecido muscular possa ser examinada (UGGLA & BUXTON, 1990; TENTER, 1995). Desta forma, têm sido desenvolvidos testes sorológicos para detecção de anticorpos e proteínas, a fim de facilitar o diagnóstico da infecção por *Sarcocystis*, como RIFI, ELISA, *Dot-Blot* e *Western Blot*. O emprego de métodos sorológicos como estes, pode ser auxiliar no diagnóstico da sarcocistose e também no diagnóstico da infecção por outros toxoplasmatíneos, como, *N. caninum* e *T. gondii*, em infecções individuais ou mistas (MORÉ et al., 2008; DUBEY et al. 1996).

O teste de ELISA utilizado a partir de extrato proteico total, usados para diferentes toxoplasmatíneos, tem demonstrado resultados falso-positivos, que podem influenciar os estudos de prevalência e controle destas doenças. Neste caso, o *Western Blot* (WB) pode ser utilizado como técnica confirmatória para suspeita destas infecções (GARCÍA-LUNAR et al., 2015). Os resultados falso-positivos podem estar associados com a possibilidade de reação cruzada com outros parasitos apicomplexas relacionados (*N. caninum*, *T. gondii* e *Besnoitia besnoiti*) (UGGLA et al., 1987).

A produção de lâminas de *Sarcocystis* spp. a partir do coração de bovinos naturalmente infectados é considerada uma ótima ferramenta no diagnóstico de sarcocistose através da RIFI (GARCIA, et al., 2008). MORÉ et al. (2008) descreveram que a RIFI em baixas diluições de ponto de corte (1:25), pode ser considerada como ótima ferramenta de diagnóstico de infecção por *S. cruzi* em bovinos. Todavia, outros estudos se referem à possibilidade de reatividade sorológica cruzada entre outros parasitos da família Sarcocystidae, utilizando a RIFI em baixas diluições (SHKAP et al., 2002; SCHARES et al., 2010). No estudo de GARCÍA-LUNAR et al. (2015) a melhor diluição observada para RIFI

sendo 1:200 em concordância com os resultados observados pelo *Western Blot* (79% e 77% de especificidade, respectivamente), quando comparado com o título de 1:100 (98% de sensibilidade e 37,7% de especificidade). Talvez o uso de *Western Blot* resulte na perda de sensibilidade, mas, resulta em alta especificidade. Uma concordância entre os resultados foi observada entre a RIFI, *Western Blot* e *Western Blot* modificado no diagnóstico de *S. neurona*, por DUARTE et al. (2003).

A técnica de *Western Blot* é um método molecular utilizado para imunodeteção de proteínas após a separação destas, por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente (KURIEN & SCOFIELD, 2006), que permite detectar, caracterizar e quantificar as proteínas presentes na amostra. Esta técnica tem como vantagens: a) proteínas imobilizadas na membrana que são uniformemente acessíveis a diferentes ligantes; b) somente uma pequena quantidade de reagentes é necessária para a análise de transferência; c) é possível fazer múltiplas réplicas do gel; d) a mesma proteína transferida pode ser usada para múltiplas análises sucessivas (KURIEN & SCOFIELD, 2006). Além disso, em estudos relacionados à detecção de anticorpos e proteínas de agentes infecciosos, é considerado altamente específico e também sensível, sendo o método de eleição para diagnóstico de inúmeras doenças dos animais (COOLEY et al., 2001; TALMI-FRANK et al., 2006). Um total de 26 antígenos de cistozoítos são reconhecidos para *S. cruzi*, sendo 8 intensivamente reconhecidos do soro de animais naturalmente infectados, que estão localizados em três principais regiões antigênicas: 55 kDa, 23-29 kDa e 18-20 kDa (GARCÍA-LUNAR, et al., 2015). Um estudo prévio, realizado por GANSTROM et al. (1990), descreveu antígenos imunodominantes de *S. cruzi* e 20 bandas, de aproximadamente 22-250 kDa, que foram consistentemente detectadas. Porém, neste estudo os autores utilizaram gel de poliacrilamida 10% e os antígenos abaixo de 22 kDa não foram visualizados.

Um método simples e barato para execução de imunoenaios foi desenvolvido a partir da modificação do ELISA, chamado *Dot-Blot*. As placas de plástico 96 poços foram substituídas por papel de nitrocelulose, como base para ligação de antígenos e precipitação do substrato cromogênico, que na forma oxidada aparece como um ponto colorido na nitrocelulose (HAWKES et al., 1982). Devido à alta capacidade de adsorção em membranas de nitrocelulose, são mais sensíveis e reprodutíveis que a utilização de placas de microtitulação de plástico usadas para ELISA. O *Dot-Blot* pode ser uma técnica versátil e alternativa para detecção de doenças causadas por protozoários em humanos e ruminantes (CHEN et al., 2014).

Entretanto, uma desvantagem da aplicação de métodos sorológicos é a alta reatividade cruzada entre diferentes *Sarcocystis* spp. que infectam o mesmo hospedeiro intermediário e tem dificultado o desenvolvimento de métodos de diagnóstico imunológico específico da espécie para *Sarcocystis* spp., não sendo possível diferenciar infecções entre *Sarcocystis* patogênico e não patogênico em hospedeiros intermediários, permitindo somente a detecção de anticorpos contra *Sarcocystis* spp. Adicionalmente, o diagnóstico imunológico de sarcocistose aguda ou aborto induzido por *Sarcocystis* é complexo pelo fato de que os níveis de anticorpos humorais geralmente são muito baixos durante a fase inicial da infecção. Consequentemente, muitas vezes não é possível detectar anticorpos específicos de *Sarcocystis* no momento clínico da doença (TENTER, 1995; DUBEY et al., 2015c).

2.8. CONTROLE E PROFILAXIA

Devido ao fato de não existir tratamento contra sarcocistose em bovinos, é necessária a adoção de medidas preventivas e de controle da doença, por meio de medidas de higiene e manejo. A excreção de oocistos e esporocistos pelos hospedeiros definitivos é o fator chave para propagação da infecção, portanto é necessário interromper este ciclo (DUBEY & LINDSAY, 2006). Desta forma, maiores esforços em educação sanitária e adoção de boas práticas na agricultura e pecuária e exclusão de cães dos abrigos de hospedeiros intermediários são fundamentais para melhorias, além do cozimento adequado das carnes antes de serem fornecidas aos carnívoros e próprio consumo humano (BUCCA et al., 2011; AIMARIA et al., 2016). Sendo assim, podem-se adotar as seguintes precauções: a) não fornecer carne crua ou mal cozida aos cães, felinos e animais selvagens, antes de serem bem cozidas para que os cistos sejam inviabilizados; ou então b) incinerar ou enterrar os animais mortos; c) manter os depósitos de grãos e alimentos cobertos para que não sejam contaminados com esporocistos oriundos das fezes de carnívoros; d) remover as fezes de cães e gatos das instalações onde os animais de produção permanecem (LOPES, 2004; DUBEY & LINDSAY, 2006).

Metodologias convencionais para prevenir doenças transmitidas por alimentos incluem a educação de consumidores, manipuladores e produtores de alimentos sobre higiene básica e cozimento suficiente, evitando a contaminação de alimentos. A desinfecção da água potável, tratamento de esgoto, pasteurização, congelamento, saneamento e uso de compostos antimicrobianos reduzem a prevalência de agentes patogênicos de origem alimentar e, consequentemente, doenças transmitidas por alimentos. Técnicas de diagnóstico como

métodos moleculares, podem aperfeiçoar a sensibilidade e especificidade e ao mesmo tempo reduzir o tempo na detecção dos parasitos de origem alimentar, melhorando a consciência sobre vigilância epidemiológica e o impacto da presença destes na segurança alimentar (ROBERTTSON et al., 2014).

O congelamento da carne a -20°C por um dia ou a -4°C por dois dias, ou ainda o cozimento da carne em temperatura acima de 70°C inativa os *Sarcocystis* spp. (FAYER, 2004; GHISLENI, 2006; NORDIC COUNCIL OF MINISTERS, 2006; AHMADI et al., 2015). A exposição ao calor a 55°C durante 20 minutos também inativa o *Sarcocystis* spp. (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Até o momento, também não há um tratamento para infecção por *Sarcocystis* em seres humanos. Portanto, além das medidas de controle e prevenção descritas acima, é importante realizar a vigilância epidemiológica através de testes diagnósticos em bovinos, humanos, fontes de água e produtos alimentícios destinados a humanos, e também em animais selvagens. A vigilância da fauna em ecossistemas naturais permite documentar a diversidade de parasitos e a sua potencial importância na etiologia das doenças na vida selvagem, pois estes têm sido identificados como agentes causadores do declínio destas populações (SMITH et al., 2009 a,b; THOMPSON et al., 2010; THOMPSON, 2013).

3. CAPÍTULO I – Artigo científico

Este capítulo originou um artigo científico que foi submetido para publicação na *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*

***Sarcocystis* species identification in cattle hearts destined to human consumption in southern Brazil**

Maiara S.T. Ferreira^{a*}, Luiza Pires Portella^a, Giovana Camillo^a, Patrícia Braunig^a, Alfredo Skrebsky Cezar^{b,c},
Sônia de Avilla Botton^a, Luis A. Sangioni^a, Fernanda S.F. Vogel^a

^aLaboratório de Doenças Parasitárias, prédio 44, sala 5149, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. * Corresponding author. E-mail address: matafner@hotmail.com (M.S.T. Ferreira).

^b Programa Nacional de Pós-Doutorado PNPd/CAPES. Programa de Pós-Graduação em Economia e Desenvolvimento (PPGE&D), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Ijuí, RS, Brazil.

Abstract

Sarcocystis spp. are ubiquitous protozoan parasites that can form cysts in striated muscle and CNS of cattle. Cattle hearts are commonly infected by microscopic sarcocysts. Humans can get infected by consuming cattle meat containing the zoonotic parasites *Sarcocystis hominis* and *Sarcocystis heydorni*. However, bovine myocardium is generally infected by the *Sarcocystis cruzi*. The aims of the study were: (a) to investigate the occurrence of sarcocysts in the cattle hearts destined to human consumption in the central region of Rio Grande do Sul, south Brazil; and (b) to investigate the presence of *S. cruzi*, *S. hirsuta*, and *S. hominis* in the cattle heart samples. Myocardium samples from a total of 314 cattle hearts destined to human consumption were collected from an abattoir located in the Central region of the Rio Grande do Sul state, southern Brazil. The presence of sarcocysts was investigated by microscopic examination. The sarcocysts isolated from 134 of these samples were subjected to DNA extraction. The extracted DNA was amplified using PCR. The PCR-amplified DNA fragments were digested with the restriction enzymes BclII and RsaI (PCR-RFLP) for differentiating among *S. cruzi*, *S. hirsuta*, and *S. hominis*. *Sarcocystis* species identification was confirmed using DNA sequencing. Sarcocysts

were detected in all the bovine myocardium samples. The PCR-RFLP analysis resulted in the identification of only *S. cruzi* from all the PCR-amplified samples. DNA sequencing also confirmed the presence of *S. cruzi* DNA. In conclusion, all the myocardium samples evaluated were infected with microscopic sarcocysts. No evidence of the presence of *S. hirsuta* or *S. hominis* was found in molecular analysis. *S. cruzi* was the only species detected infecting the cattle hearts.

Keywords: *Sarcocystis*, bovine, myocardium, public health.

1. Introduction

Sarcocystis spp. are ubiquitous protozoan parasites that require two hosts for completing their life cycle (Fayer et al., 2015). These protozoan species can cause gastrointestinal disorders in the definitive hosts (DH), such as humans or carnivores, due to the presence of parasites in the gastrointestinal tract (Bucca et al., 2011; Dubey et al., 2015). The intermediate hosts (IH) become infected by ingesting the parasitic sporocysts released in the DH feces (Dubey and Lindsay, 2006). Cattle can act as the IH for several *Sarcocystis* species, which have carnivores or primates as their DH: *S. cruzi* (canids as DH), *S. hirsuta* (felids as DH), *S. hominis* (primates, including humans, as DH), and *S. rommeli* (currently unknown DH) (Dubey et al., 2015; Xiang et al., 2011). A recent molecular characterization study revealed that the other two species, previously misidentified as *S. sinensis*, have cattle as their IH: *S. bovifelis* (cats as DH) and *S. bovini* (cats as potential DH) (Gjerde, 2016a, b). Additionally, under experimental conditions, the infection caused by a novel species of genus *Sarcocystis* (*S. heydorni*) in humans (as DH) and cattle (as IH) was recently proven (Dubey et al., 2015). Outbreaks of human sarcocystosis has been reported from some countries of Asia caused by the ingestion of *S. nesbitti* sporocysts contaminating food or water (CDC, 2012; Esposito et al., 2012).

In several countries including Brazil, the prevalence of *Sarcocystis* spp. infection in cattle herds is ~90% to 100% (Akhlaghi et al., 2016; Moré et al., 2011; Ruas et al., 2001). Cattle sarcocystosis is a chronic disease characterized by mild myositis; however, it can cause severe economic losses due to a decrease in milk production, increased frequency of abortion, birth of weak calves, carcass condemnation, and even mortality (Fayer et al., 1983; Hamidinejat et al., 2015; Vangeel et al., 2013). Usually, macroscopic lesions are not observed in the infected animals and the diagnosis depends on microscopic examination of the muscle samples taken from the target tissues, such as the heart, tongue, esophagus, and diaphragm (Dubey et al., 2016).

In cattle herds, while the prevalence of *S. cruzi* infection is generally very high, the prevalence of *S. hirsuta* and the zoonotic *S. hominis* infections is highly variable (Dubey et al., 2016; Moré et al., 2011). Infection by microscopic sarcocysts is usually asymptomatic and these microcysts are not detectable by the routinely used techniques of inspection at abattoirs. On regards to the cattle hearts, *S. cruzi* is highly prevalent, while *S. hirsuta* or *S. hominis* were not yet reported (Dubey et al., 2016). However, studies on species identification of microscopic sarcocysts are scarce in several countries, including Brazil. Additionally, the same bovine can be infected by multiple *Sarcocystis* spp. (Lopes, 2004; Moré et al., 2013, 2014), some of which are not morphologically distinguishable, except by transmission electron microscopy technique (Gjerde et al., 2016a). Thus, molecular identification of the *Sarcocystis* spp. present in the cattle tissues destined to human consumption is essential for public health and cattle production concerns.

Therefore, the objectives of this study were to evaluate the frequency of *Sarcocystis* spp. infection and to investigate the occurrence of *S. cruzi*, *S. hirsuta*, and *S. hominis*, in cattle hearts destined to human consumption in the central region of Rio Grande do Sul state, southern Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Sample collection and microscopic examination

Myocardium samples were obtained from the 314 bovine hearts collected from an abattoir under Municipality Inspection Service (SIM) located in Santa Maria city, Rio Grande de Sul state, southern Brazil. Sampling consisted of collection of an approximately 50 g piece of myocardium from each heart stored in the abattoir facilities. At least four and up to nine hearts were weekly collected. This procedure was adopted to avoid inclusion of many samples from the same herd. All the slaughtered animals were from commercial herds located in the Central region of Rio Grande do Sul (see the map in the Figure A).

Samples were collected along the years 2013 and 2014. First year, 180 samples were collected from August to December 2013 and subjected to fresh microscopic examination. Second year, 134 samples were collected from April to December 2014, subjected to fresh microscopic examination, and destined to molecular analysis.

For microscopic examination, each 50 g sample was cut in ten small pieces of approximately 5 g. Each 5 g piece was separately minced in a Petri dish (using a scalpel blade), diluted and homogenized with 20 ml PBS. This mixture was filtered through a sterile gauze to a new Petri dish and observed using light microscopy at

400 × magnification for the sarcocysts visualization and morphological examination. The samples were considered to be positive, if at least one characteristic sarcocyst (see the Figure B) was observed (Saito, 1984).

2.2. Identification of *Sarcocystis* spp. DNA

Sarcocysts subjected to molecular analysis were isolated from each of the 134 myocardium samples collected in the year 2014. During the microscopic examination, ten sarcocysts per heart were collected using a 200 µL micropipette and stored in microtubes at -20 °C for molecular analysis.

In addition, ten negative bovine fetal heart samples were used as the negative controls for the PCR reaction. Fetal myocardium samples were taken from the carcasses of fetuses collected during the viscera inspection of the slaughtered cows in the year 2014. All of these cows were in the first-third of pregnancy. Fetal myocardium was cut and microscopically inspected as described above, however, up to the entire organ examination. Thus, the absence of sarcocysts was confirmed. After, aliquots (1 ml) of PBS solution containing fetal myocardium fragments were stored at -20 °C for further DNA extraction.

DNA extraction was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega™, Madison, USA), as recommended by the manufacturer. However, the lysis step was slightly modified (performed at 55 °C for 16 h) to improve the sarcocyst disruption efficiency (Moré et al., 2011). Amplification of a 18S rDNA gene fragment was performed based on the sequences described by Holmdahl et al. (1993, 1994) and Yang et al. (2002) for further *Sarcocystis* species discrimination using restriction enzymes. Each sample was subjected to PCR and the approximately 700-bp 18S ribosomal DNA (rDNA) fragment was amplified using the following primer pair: SarcoF, 5'-CGCAAATTACCCAATCCTGA-3'; and SarcoR, 5'-ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG-3' (Moré et al., 2011). The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min; followed by 35 cycles at 94 °C for 45 s, 55 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s; and final extension at 72 °C for 5 min. PCR was performed using the T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Each PCR experiment also included reaction tubes containing DNA extracted from the negative bovine fetal heart samples and DNA-free MilliQ water as the negative controls, and the previously characterized *S. cruzi* DNA as the positive control. Characterization was made using microscopic examination, PCR, and PCR-RFLP. This *S. cruzi* DNA sample was used at each PCR round to monitoring the reaction efficiency. The PCR products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels containing the SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, USA) and visualized using a UV transilluminator.

2.3. *Sarcocystis* species differentiation

The PCR-positive DNA samples were digested using the restriction enzymes BclI and RsaI (Promega™, Madison, USA) as described by Yang et al (2002) and Moré et al. (2011). For this, each enzyme (5 U) was individually added to the DNA amplicon (5 µL) and Buffer C (10 ×, 2 µL; Promega™, Madison, USA), and the reaction volume was made up to 20µL. The reaction mixture was incubated at 55 °C for 1 h with BclI, or at 37 °C for 6 h with RsaI. The restriction digestion products were analyzed under a UV light source, after subjecting them to electrophoresis on a 2% agarose gel containing the SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, Carlsbad, USA). The resulting fragments allowed the identification of different *Sarcocystis* species as follows: *S. cruzi*, identified by the presence of a single RsaI restriction site; *S. hirsuta*, identified by the presence of two restriction sites: one restriction site each for BclI and RsaI; or *S. hominis*, identified by undigested DNA (Hooshyar et al., 2017; Moré et al., 2011; Yang et al., 2002). Estimated fragments were provided based on *Sarcocystis* spp. 18S rDNA sequences, *S. hirsuta* (GenBank: AH006015.2) generates a 684bp fragment by PCR, digested by BclI (266bp and 418bp) and RsaI (247bp and 437bp); and *S. cruzi* (GenBank: KT901167.1) generates a 674bp fragment, digested only by RsaI (301bp and 373bp).

2.4. *Sarcocystis* species confirmation by DNA sequencing

One DNA sample showing the *S. cruzi*-specific restriction pattern was randomly selected and subjected to DNA sequencing. For this purpose, the genomic DNA extracted from the sample was PCR amplified using the following primers, designed for the amplification of a 636-bp fragment of the *Cox1* gene: SF1, 5'-ATGGCGTACAACAATCATAAAGAA-3'; and CoxS1R, 5'-TTACCCATGACCACACCTGTAGTACC-3', as described by Gjerde (2013). The PCR product was subjected to agarose gel electrophoresis, purified using the QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen™, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions, visualized under UV light, and submitted for DNA sequencing. The DNA samples were sequenced at the ACTGene Análises Moleculares Ltda. Laboratories (Biotechnology Center, UFRGS; Porto Alegre, RS, Brazil). The nucleotide sequences obtained were edited using StandenPackage software and analyzed using the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The sequences were compared to the *Sarcocystis* species DNA sequences of the Cox1 gene in GenBank.

3. Results and Discussion

The microscopic examination revealed that the *Sarcocystis* spp. sarcocysts presenting thin wall were present in all the cattle heart samples analyzed (Figure B). In cattle, a high prevalence of sarcocystosis is commonly observed in several regions of the world, such as Mongolia, Vietnam, Iran, and Italy (Fukuyo et al., 2002; Jehle et al., 2009; Nourani et al., 2010; Bucca et al., 2011). The high incidence of sarcocysts infection observed in our study was not surprising, since Ruas et al. (2001) have previously reported a 100% prevalence of *Sarcocystis* spp. infections in cattle from a neighboring region (South of the Rio Grande do Sul). In addition, Moré et al. (2011) described a 99.5% prevalence of sarcocystosis in cattle heart samples from Argentina (a neighboring country) (see the map in the Figure A).

In the present study, the *Sarcocystis* spp. DNA was successfully amplified from 58% (78/134) of the samples subjected to molecular analysis. It is important to highlight that these results were satisfactory because of the known difficulties in isolating DNA from the sarcocysts (Yang et al., 2002; Jehle et al., 2009; Moré et al., 2011; Braunig et al., 2016). During species identification by PCR-RFLP, all samples displayed a *S. cruzi*-specific restriction digestion pattern (Figure C). Additional confirmation for the identification of *Sarcocystis* species was provided by sequencing a Cox1 gene fragment in one *Sarcocystis* DNA sample. As result, 100% sequence similarity was observed with the KT901094.1 and KT901093.1 sequences of the *S. cruzi* genome that were deposited in GenBank (Gjerde et al., 2016b).

High prevalence of *S. cruzi* infecting cattle hearts was already reported in other countries (Dubey et al., 2016; Moré et al., 2008). Although *S. hirsuta* and *S. hominis* were not yet detected in cattle hearts (Dubey et al., 2016), these species were included in the species differentiation because they have been found in raw kibbe containing cattle meat in Brazil (Pena et al., 2001). Ranging prevalence of *S. cruzi*, *S. hirsuta*, and *S. hominis* were already detected in beef or raw hamburgers in other countries as Japan (Ono & Ohsumi, 1999), Iran (Hajimohammadi et al., 2014; Hooshyar et al., 2017), and Germany (Moré et al., 2014). In São Paulo city (southeastern Brazil, see the Figure A), using electron microscopy, Pena et al. (2001) showed that all the raw kibbe samples collected from the 25 restaurants were contaminated with *Sarcocystis* spp.: *S. hominis* (94%), *S. cruzi* (92%), and *S. hirsuta* (70%). In addition, diarrhea and sporocyst excretion in feces were observed in 6 volunteers who consumed the *S. hominis*-containing raw kibbes.

Although data from the other regions of Brazil are limited, the identification of *Sarcocystis* spp. in different cattle tissues has already been performed in other countries. In Argentina, although the prevalence of *S. cruzi* was very high (99.5%), the levels of *S. hominis* and *S. hirsuta* sarcocysts detected in beef samples were low (Moré et al., 2011). In Iran, high prevalence of *S. cruzi* infection was found (98.9%; 87/101), the prevalence of

mixed infection with *S. hominis* and *S. cruzi* in the cattle diaphragm muscle samples was 53.3% (48/101), and infection due to *S. hominis* alone was detected in only one sample (1.1%; 1/101) (Akhlaghi et al., 2016).

S. cruzi is known to be the most common and pathogenic *Sarcocystis* species infecting the cattle worldwide (Böttner et al., 1987; Dubey et al., 2016; Fukuyo et al., 2002; Moré et al., 2008, 2011). The high frequency of occurrence of sarcocysts in the IH myocardium can be attributed to the parasitic infection route through the digestive tract, from where the parasites can access the systemic circulation and reach the cardiac muscle via the venous system (Dubey et al., 2016; Ruas et al., 2001). Several factors can explain the ubiquitous occurrence of *Sarcocystis* spp. in animals. These protozoans can infect a variety of DH and IH, which subsequently develop poor immunity against reinfections. Since the parasite completes its development inside the intestinal lamina propria, the DH can excrete a large number of oocysts in the feces over several months. Both oocysts and sporocysts are resistant to environmental conditions and can also be disseminated by invertebrates (Fayer et al., 2015; Dubey et al., 2015). The high prevalence of *S. cruzi* infection in cattle can be explained by free access of the domesticated and wild carnivores to pastures, feeders, and water sources meant for cattle, in addition to the frequent use of dogs in cattle management. The dogs can acquire this parasite by consuming cattle viscera and carcass (Lopes, 2004; Dubey and Lindsay, 2006; Ruas et al., 2001).

This close relationship between the dogs and cattle is often found on the farms in Brazil and Argentina. Our results indicated a very high prevalence of *S. cruzi* infections in the cattle from southern Brazil. This infection may be responsible for economic losses in the cattle industry (Moré et al., 2011; Vangeel et al., 2013; Hamidinejat et al., 2015). Therefore, our results reveal the importance of further investigations in determining the potential losses caused by sarcocystosis in cattle herds from southern Brazil and effective programs for bovine sarcocystosis control.

4. Conclusion

A high frequency of *Sarcocystis* sarcocysts was found in cattle hearts destined to human consumption in the central region of Rio Grande do Sul. *S. hirsuta* or the zoonotic parasite *S. hominis* were not identified in the samples subjected to molecular analysis. However, *S. cruzi* is disseminated in the studied cattle population.

Acknowledgments Alfredo S. Cezar is grateful to the Brazilian National Post-doctoral Program of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (PNPD/CAPES; project no. 20132641).

Compliance with ethical standards All experimental practices involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Protocol number 87352511).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Akhlaghi, M., Razavi, M., Hosseini, A., 2016. Molecular differentiation of bovine sarcocysts. *Parasitol. Res.* 115, 2721–2728.
- Böttner, A., Charleston, W.A., Pomroy, W.E., Rommel, M., 1987. The prevalence and identity of *Sarcocystis* in beef cattle in New Zealand. *Vet. Parasitol.* 24, 157–168.
- Bräunig, P., Portella, L.P., Cezar, A.S., Libardoni, F., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., Gonçalves, P.B.D. 2016. DNA extraction methods and multiple sampling to improve molecular diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle hearts. *Parasitol. Res.* 115, 3913–3921.
- Bucca, M., Brianti, E., Giuffrida, A., Ziino, G., Cicciari, S., Panebianco, A., 2011. Prevalence and distribution of *Sarcocystis* spp. cysts in several muscles of cattle slaughtered in Sicily, Southern Italy. *Food Control*, 22, 105–108.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012. Notes from the field: acute muscular sarcocystosis among returning travelers – Tioman Island, Malaysia, 2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 61, 37–38.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2006. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 22, 645–671.
- Dubey, J.P., van Wilpe, E., Calero-Bernal, R., Verma, S.K., Fayer, R., 2015. *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. *Parasitol. Res.*, 114, 4143–4147.
- Dubey, J.P., 2015. Foodborne and waterborne zoonotic sarcocystosis. *Food and Waterborne Parasitol.*, 1, 2–11.
- Dubey, J.P.; Calero-Bernal, R.; Rosenthal, B.M.; Speer, C.A.; Fayer, R. 2016. *Sarcocystosis of Animals and Humans*, Second Edition. CRC Press. pp.1–481.
- Esposito, D.H., Freedman, D.O., Neumayr, A., Parola, P., 2012. Ongoing outbreak of an acute muscular *Sarcocystis*-like illness among travelers returning from Tioman Island, Malaysia, 2011–2012. *Euro Surveill.* 17, 20310.

- Fayer, R., Lynch, G.P., Leek, R.G., Gasbarre, L.C., 1983. Effects of sarcocystosis on milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 66, 904-908.
- Fayer, R., Esposito, D.H., Dubey, J.P., 2015. Human infections with *Sarcocystis* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28, 295-311.
- Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B., 2002. Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. [Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health](#), 33, 490–495.
- Gjerde, B., 2013. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *Int. J. Parasitol.*, 43, 579–591.
- Gjerde, B., 2016a. The resurrection of a species: *Sarcocystis bovifelis* Heydorn, et al., 1975 is distinct from the current *Sarcocystis hirsuta* in cattle and morphologically indistinguishable from *Sarcocystis sinensis* in water buffaloes. *Parasitol. Res.* 115, 1-21.
- Gjerde, B., 2016b. Molecular characterization of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos Taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Parasitol. Res.* 115, 1473-1492.
- Hamidinejat, H., Jalali, M.H.R., Gharibi, D., Molayan, P.H., 2015. Detection of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Iran by PCR-RFLP. *J. Parasitic Diseases*, 39, 658-662.
- Hajimohammadi, B., Dehghani, A., Ahmadi, M. M., Eslami, G., Oryan, A., Khamesipour, A., 2014. Prevalence and species identification of *Sarcocystis* in raw hamburgers distributed in Yazd, Iran using PCR-RFLP. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 1, 15-20.
- Holmdahl, O. J. M., Mattsson, J. G., Uggla, A., Johansson, K. E., 1993. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from *Sarcocystis* species. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 481-486.
- Holmdahl, O. J. M., Mattsson, J. G., Uggla, A., Johansson, K. E., 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 119, 187-192.
- Hooshyar, H., Abbaszadeh, Z., Sharafati-Chaleshtori, R., Arbabi, M., 2017. Molecular identification of *Sarcocystis* species in raw hamburgers using PCR–RFLP method in Kashan, central Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 41, 1001-1005.
- Jehle, C., Dinkel, A., Sander, A., Morent, M., Romig, T., Luc, P.V., De, T.V., Thai, V.V., Mackenstedt, U., 2009. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Vet. Parasitol.*, 166, 314–320.

- Lopes, C.W.G., 2004. O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (Apicomplexa: Sarcocistidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 13, (1).
- 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 MC., 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. Vet. Parasitol. 177, 162–165.
- Moré, G., Schares, S., Maksimova, A., Franz, J.C., Venturini, M.C., 2013. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. Vet. Parasitol. 197, 85–94.
- Moré, G., Pantchev, A., Skuballa, J., Langenmayer, M.C., Maksimov, M.C., Conraths, F.J., Venturini, M.C., Schares, G., 2014. *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. Parasitol. Res., 113, 2223–2230.
- Nourani, H., Matin, S., Nouri, A., Azizi, H., 2010. Prevalence of thin-walled *Sarcocystis cruzi* and thick-walled *Sarcocystis hirsuta* or *Sarcocystis hominis* from cattle in Iran. Trop. Anim. Health Prod., 42, 1225–1227.
- Ono, M., Ohsumi, T., 1999. Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). Parasitol. Int., 48, 91-94.
- Pena, H.F.J., Ogassawara, S., Sinhorini, I.L., 2001. Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of São Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. J. Parasitol., 87, 1459-1465.
- Ruas, J.L., Cunha, C.W., Silva, S.S., 2001. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Agrociência, 7, 227-230.
- Saito, M., Shibata, Y., Azuma, H., Itagaki, H., 1998. Distribution of *Sarcocystis cruzi* cysts in bovine striated muscles. Japan Med. Assoc. J., 51, 453-455.
- Vangeel, L., Houf, K., Geldhof, P., De Preter, K., Vercruyssen, J., Ducatelle, R., Chiers, K., 2013. Different *Sarcocystis* spp. are present in bovine eosinophilic myositis. Vet. Parasitol. 197, 543–548.
- Xiang, Z., He, Y., Zhao, H., Rosenthal, B.M., Dunams, D.B., Li, X., Feng, G., Cui, L., Yang, Z., 2011. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. Exp. Parasitol., 127, 460–466.
- Yang, Z.Q., Li, Q.Q., Zuo, Y.X., Chen, X.W., Chen, Y.J., Nie, L., Wei, C.G., Zen, J.S., Attwood, S.W., Whang, X.Z., Zhang, Y.P., 2002. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP

analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Exp. Parasitol.*, 102, 212–217.

Figure 1. Location of the Rio Grande do Sul state, Brazil, is marked (painted in black) in the South America map. The expanded map shows the location of the studied region (Central region) and where other studies on the occurrence of sarcocysts in cattle muscles or meat were performed in Brazil and neighboring country Argentina.

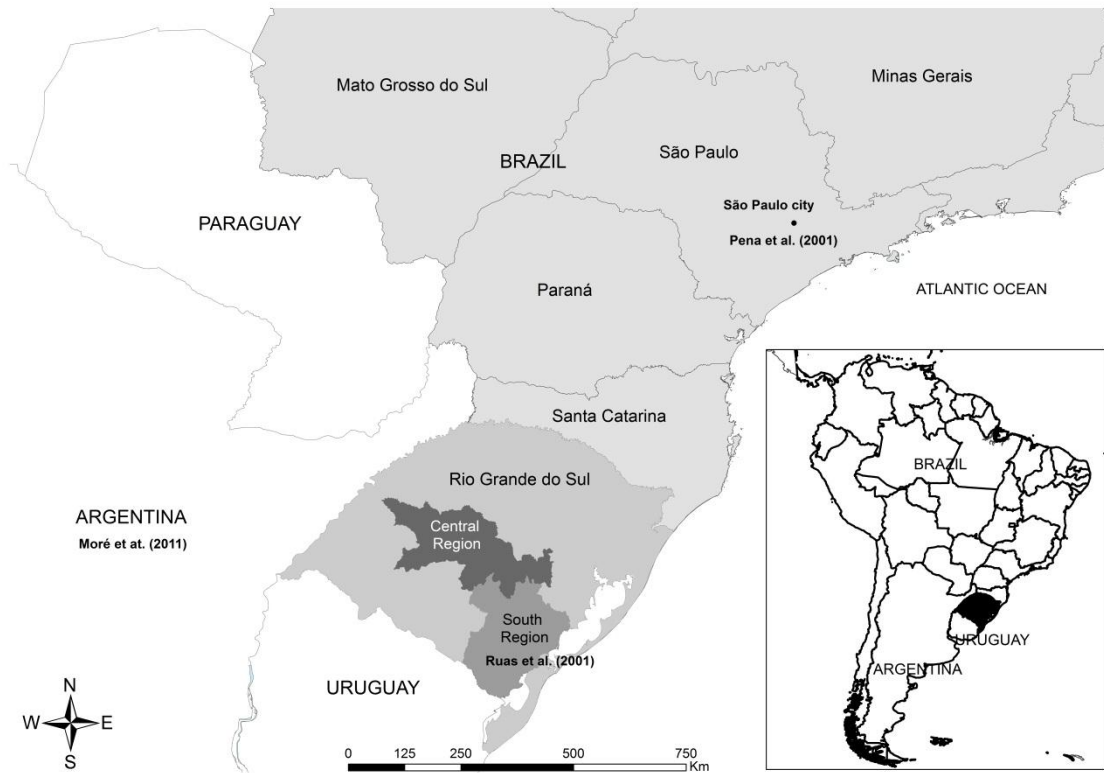


Figure 2. Light microscopy of non-stained *Sarcocystis* spp. microcysts isolated from the myocardium of cattle slaughtered in an abattoir located in the Central region of Rio Grande do Sul state, southern Brazil. Notice the thin wall containing some hair-like villar protrusions (black arrows) and the septa dividing the internal compartments (white arrows) in the entire sarcocysts pictures (1, 2) and detailed picture (3). 400x magnification.

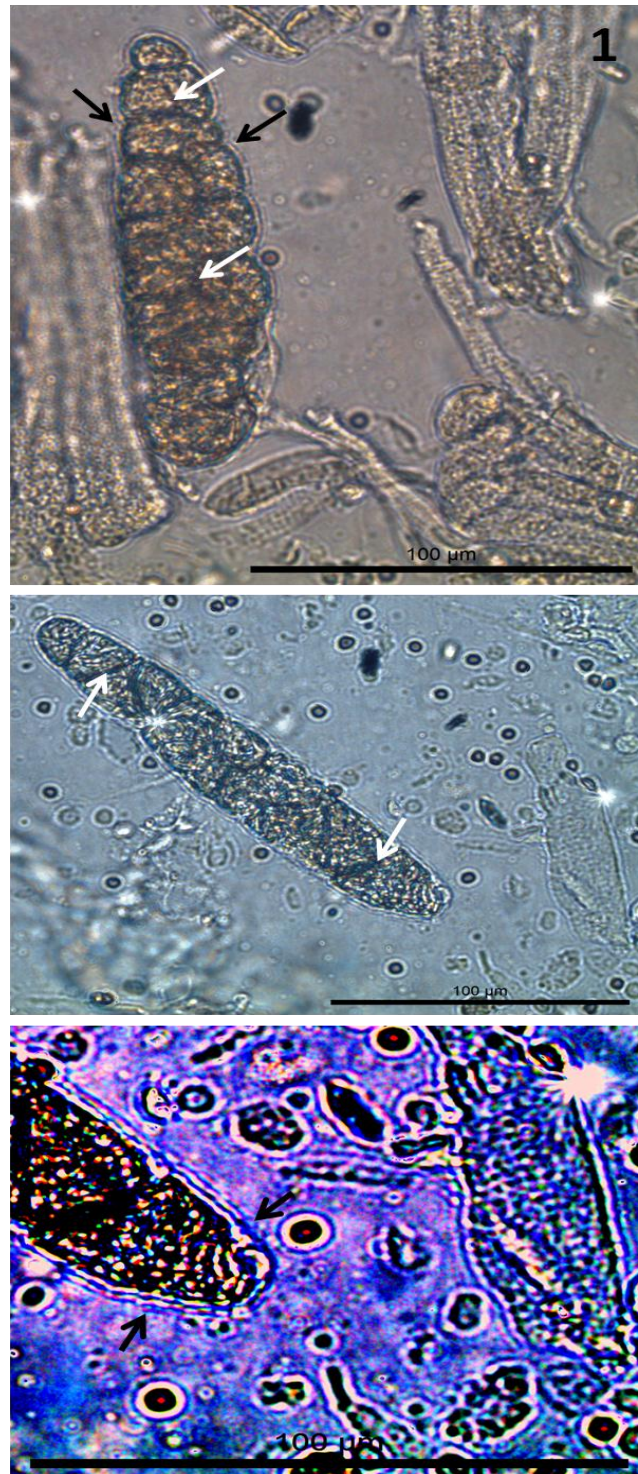
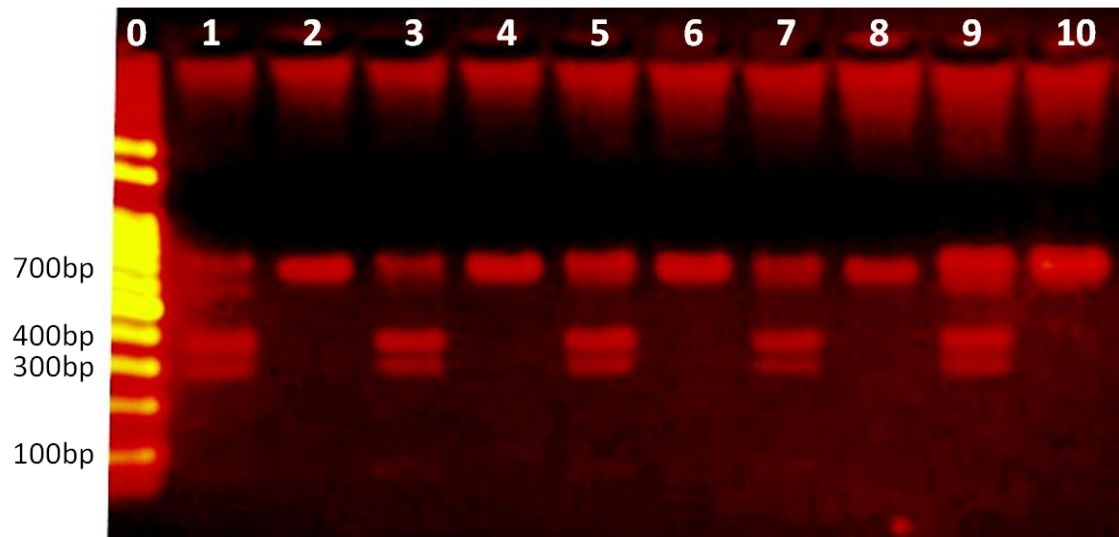


Figure 3. Agarosis gel after electrophoresis running showing *S. cruzi* DNA restriction pattern resulting from PCR-RFLP using *Bcl*I and *Rsa*I enzymes. Column 0: 100bp DNA ladder. Columns 1, 3, 5, 7, and 9: 700bp DNA fragment digested by *Rsa*I (approximately 300 bp and 400 bp fragments). Columns: 2, 4, 6, 8, and 10: 700bp DNA fragment undigested by *Bcl*I.



4. CAPÍTULO II – Nota científica

Este capítulo originou uma nota científica a ser submetido para publicação na revista Parasitology Research

***Sarcocystis* spp. detection in cattle by different diagnostic methods**

Maiara S.T. Ferreira^{1*}, Alfredo Skrebsky Cezar^{2,3}, Patrícia Bräunig¹, Fagner Fernandes¹, Luis A. Sangioni¹,
Fernanda S.F. Vogel¹

Abstract

Cattle are considered intermediate hosts of *Sarcocystis*, that can cause clinical signs and lower performance in the acute phase of infection, specially related to *Sarcocystis cruzi*. The prevalence of this parasitic disease in adult cattle can reach 100% in many countries. *Sarcocystis* spp. usually are not visible at naked eye during cattle *post mortem* inspection. Furthermore, fresh microscopic examination and transmission electron microscopy techniques are difficult to apply in a large number of samples. Therefore, wide studies on *Sarcocystis* infection in cattle can be made using molecular and serologic methods. The aims of this study were to investigate the infection by *Sarcocystis* spp. in cattle using fresh microscopic examination of myocardium samples and PCR and to compare these results to the presence of antibodies against *Sarcocystis* spp. in serum samples detected by the indirect fluorescent antibody test (IFAT). Fifty cattle myocardium and corresponding blood serum samples were collected. Myocardium samples were subjected to light microscopy and PCR to investigate the presence of *Sarcocystis* spp. infection. Serum samples were tested for the presence of antibodies against *Sarcocystis* spp. using IFAT. Microscopic sarcocysts were observed in 100% of the myocardium samples and the presence of *Sarcocystis* DNA was confirmed from 86% (43/50) of these cyst samples. Antibodies against *Sarcocystis* spp. were detected in 96% (48/50) and 80% (40/50) of serum samples, at 1:25 and 1:200 dilution, respectively. The three methods used allowed to detect *Sarcocystis* spp. infection an IFAT showed a good sensitivity compared

¹ Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, prédio 44, sala 5149, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Corresponding author: matafner@hotmail.com; (+55) 055-3220-807. (M.S.T.Ferreira).

² Programa Nacional de Pós-Doutorado PNP/D/CAPES. Programa de Pós-Graduação em Economia e Desenvolvimento (PPGE&D), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³ Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Ijuí, RS, Brazil.

with fresh microscopic examination and allows the diagnosis of infection in animals still alive, in a large scale and monitoring the status of the herd.

Keywords: Sarcocystosis; bovine; indirect fluorescent antibody test; fresh microscopic examination; PCR.

Sarcocystosis is one of the most prevalent parasitic diseases of cattle in several regions of the world (Bucca et al., 2011; Akhlaghi et al., 2016). The prevalence of *Sarcocystis* spp. in naturally infected cattle has been investigated in many countries and infection rates can vary depending on several factors as system of breeding, animals age and anatomical site of diagnosis (Dubey et al., 2016). Cattle are intermediate hosts of important *Sarcocystis* species: *S. hirsuta* and *S. hominis*, macrocysts-forming species and *S. cruzi*, *S. bovifelis*, *S. bovini*, *S. rommeli* and *S. heydorni*, microcysts species (Moré et al., 2011; Hamidinejat et al., 2015). *Sarcocystis* can induce weight loss, general weakness, fever, anorexia, abortion and death in domestic animals especially in those infected by *S. cruzi*, where clinical signs and lower performance could be observed in the acute phase of infection (Hamidinejat et al., 2015).

At post mortem inspection in cattle, Sarcocystosis is usually not visible at naked eye and diagnosis can be made by microscopic observation of muscular tissues (Bucca et al., 2011). Fresh examination by light microscopy is employed to demonstrate the occurrence of cysts in tissues and transmission electron microscopy has been required to establish *Sarcocystis* identity based on the cyst wall ultrastructure (Akhlaghi et al., 2016). However, transmission electron microscopy is not applied for large detection studies. Molecular diagnosis such as polymerase chain reaction (PCR) is important to confirm infection by *Sarcocystis* and to accomplish epidemiologic studies (Bucca et al., 2011; Moré et al., 2011; Vangeel et al., 2013). Subclinical infected animals may remain as infection source and serological diagnosis are crucial for detecting these animals in large scale aiming to establish control measures in farms (Álvarez-García et al., 2014; García-Lunar et al., 2015). The indirect fluorescent antibody test (IFAT) has widely been applied to determine specific antibody levels (Moré et al., 2008; 2011, García-Lunar et al., 2015). Therefore the aims of the present study were: a) to investigate cattle infection by *Sarcocystis* spp. in myocardium samples, through the direct microscopic examination and confirm the identity of the detected cysts by PCR and b) compare the frequency of parasite detection in the myocardium samples to the frequency of anti-*Sarcocystis* spp. antibodies detection in serum samples from the same at two different dilutions.

Myocardium and blood samples from adult beef cattle (n=50) of both sexes were randomly collected once a week, from April to July 2017, from an Officially Inspected abattoir located in Santiago city, Rio Grande do Sul state, southern Brazil. All the slaughtered animals were from commercial herds located in the Central region of Rio Grande do Sul. Also were collected ten samples of bovine fetal heart during the viscera inspection of the slaughtered cows in the first-third of pregnancy to be analyzed by the microscopic fresh examination and molecular methods.

Approximately 50 g of each myocardium was minced to a fresh microscopic examination. Each muscle was first scarified with scalpel blades and macerated in Petri dish in ten pieces of approximately 5g and then diluted and homogenized with 20 mL phosphate-buffered saline solution (PBS; phosphate 0.1M, NaCl 0.33M, pH 7.2). The homogenate was filtered using sterile gauze and transferred to other Petri dish and observed using light microscopy at 400× magnifications for sarcocysts visualization. Samples were classified as positive or negative for the presence of sarcocysts (Saito, 1984) being positive if at least one sarcocyst was observed. Ten cysts were collected from each sample with a micropipette and stored in microtubes at -20°C until DNA extraction for further molecular analysis (Moré et al., 2011). In addition, ten negative bovine fetal heart samples were used as the negative controls for the PCR reaction. Whole tissue of fetal hearts was cut and microscopically inspected as described above and so the absence of sarcocysts was confirmed, aliquots of 1 mL of PBS solution containing fetal myocardium fragments were stored at -20°C until the next step (DNA extraction and PCR).

DNA was isolated from 10 collected cysts using the *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega™, Madison, USA), according to the manufacturer's recommendations. The lysis step was slightly modified (carried out at 55 °C for 16h) (Moré et al. 2011). The final concentration of total extracted DNA was estimated using a Nano Drop ND-1000 spectrophotometer and then PCR was performed to amplify a ~700 bp fragment from the 18S ribosomal DNA (rDNA) gene using the specific primer pair: SarcoF 5'-CGCAAATTACCCAATCCTGA-3' and SarcoR 5'-TTTCTCATAAGGTGCAGGAG-3' as described by Yang et al. (2002). The PCR cycling conditions were performed as described by Moré et al. (2011) using the T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). DNA isolated from previously characterized *Sarcocystis* spp. was included as positive control of the reaction, DNA extracted from bovine fetal heart negative for sarcocyst and DNA-free MilliQ water were the negative controls. The PCR products were visualized after electrophoresis on 1% agarose gels containing SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, USA) and visualized using a UV transilluminator.

Ten mL of blood were collected from each animal at the time of the slaughter. As the same way, ten samples of blood of bovine fetal hearts was collected during the viscera inspection of the slaughtered cows in the first-third of pregnancy, and used as negative controls for the IFAT. Sera obtained from blood samples were stored at -20°C until processing by IFAT to anti-*Sarcocystis* spp. antibodies detection. Bradyzoites obtained from naturally infected bovine hearts were purified and used as antigen according to a previously described procedure (García-Lunar et al, 2015). Serum samples were diluted in PBS at 1:25 and 1:200 dilutions and analyzed for *Sarcocystis* spp. antibodies (García-Lunar et al, 2015). A rabbit antibovine IgG fluorescein isothiocyanate conjugate (Sigma Bio Sciences, St. Louis, MO, USA) was used as secondary antibody. Negative sera from bovine fetal serum as described above well as positive sera from a naturally infected bovine with *Sarcocystis* spp. were used as controls for IFAT. Slides were examined using a fluorescence microscope under a $\times 400$ magnification (Leica CTR 4000/EBQ 100, Leica Microsystems GmbH, Germany). Complete peripheral but not apical fluorescence of cystozoites was considered positive.

To statistical analysis the Kappa coefficient test and test of sensitivity and specificity were applied to evaluate the results among the techniques (Thrusfield, 2007).

The frequency of *Sarcocystis* detection by fresh examination was 100% in bovine adult heart samples (50/50). This finding is in agreement with studies from other countries which reported high prevalence of sarcocystosis (Fukuyo et al., 2002; Moré et al., 2008; Bucca et al., 2011) and studies in the same region showed 100% prevalence in cattle cardiac muscle analyzed by the same technique (Ruas et al., 2001). Therefore the present study in accordance with the results of previous studies suggests fresh microscopic examination as gold standard for *Sarcocystis* spp. diagnosis. The high number of cysts in adult cattle can be used as an indicator of *Sarcocystis* infection intensity and according to other studies sarcocysts number may increase with age probably because of more time expose to sporocysts or to the lack of immunological control of reinfections (Ono and Osumi, 1999; Ghisleni et al; 2006; Bucca et al., 2011). The cattle high level of *Sarcocystis* infection demonstrates the close contact between intermediate and definitive hosts which can be related to appropriately sanitary conditions of husbandry practice (Bucca et al, 2011; Moré et al., 2008; 2011).

Specific antibodies against *Sarcocystis* spp. were detected in 96% (48/50) and 80% (40/50) of serum samples examined by IFAT with titers of 25 and 200, respectively. Moré et al. (2008) showed that titers of 25 are indicative of infection by *Sarcocystis* as they could be confirmed with the parasitological findings, and at the same time they also observed a high number of bovines with antibody levels equal or higher than 1:200.

Serological methods are important for detecting subclinical infected animals that represents important infection source (Álvarez-García et al., 2014). None of the bovine fetal serum samples (10/10) demonstrated antibodies against *Sarcocystis* spp. PCR amplification products were detected in 86% (43/50) of samples. This could be due to insufficient parasite DNA obtained from extraction and used for PCR (Moré et al., 2011), since as samples with concentrations lower than 9 ng/μL did not allow the amplification of *Sarcocystis* DNA. In addition, cysts were not specie characterized prior to PCR therefore there is the possibility of mixed infections (Rosenthal et al., 2008).

Two negative animals were found in IFAT at 1:25 dilution (48/50; 45) and ten animals were negative in IFAT at 1:200 dilutions (10/50; 20%) but with no agreement with negative animals on molecular methods (7/50; 14%). The low titer of antibodies present in serum samples probably resulted in the negative IFAT results. However, some positive animals in IFAT did not present *Sarcocystis* DNA detection by PCR (7/48; 14,5% at 1:25 and 5/40; 12.5% at 1:200 dilutions, respectively) probably due insufficient amount of DNA extracted from the cysts as discussed above (Moré et al., 2011). The high level of infection reported in the present study may cause severe economic losses due the possibility of reduction of meat quality, reduction of weight gain and carcasses condemnation (Dauguschies et al. 2000; Bucca et al., 2011). The high frequency of infection in cattle is probably caused by consumption of food or water contaminated by feces from infected dogs which are infected eating contaminated bovine viscera and organs or carcasses (Ford, 1986).

Despite fresh microscopic examination to be a qualitative diagnostic method and it remains the gold standard test to detect *Sarcocystis* infection because of its high sensitivity, PCR is extremely important for species identification, characterization and epidemiological studies (Moré et al., 2011; Bucca et al., 2011; Vangeel et al., 2013). The statistical analysis results comparing fresh microscopic examination and IFAT techniques demonstrated the greater sensitivity and specificity of fresh microscopic examination (Tabela 2). Besides that, fresh microscopic examination allows the visualization of intact and ruptured cysts and merozoites with movement (Ruas et al., 2001). IFAT fails in *Sarcocystis* diagnostic is because the floating antibodies levels because infected animals are not always presenting levels of antibodies detectable by this technique. Although the IFAT has demonstrated a lower sensitivity than fresh microscopic examination, serologic test has great value in evaluating a large number of samples showing the serologic status of the herd and detect both acute and chronically infected animals, still alive presenting clinical signs or not (García-Lunar et al., 2015).

Sarcocystis spp. infection in beef cattle was detected by at least one of the laboratory techniques employed in this study. Fresh microscopic examination is the gold standard method to diagnose infections in adult cattle but can only be performed at *post-mortem* inspection and is laborious making difficult to test a large number of samples. PCR can confirm the species involved in the infection and carrying out epidemiological studies, but also allows the detection of infection after death of the animal, so IFAT may be necessary to detect *Sarcocystis* spp. infection in adult live cattle, as demonstrated good sensitivity and specificity compared to fresh microscopic examination. Therefore, the three methods used allowed to detect *Sarcocystis* spp. infection and diagnostic studies are important to appropriately identify the parasite involved in the infection and highlight the parasite epidemiology.

Acknowledgments Alfredo S. Cezar is grateful to the Brazilian National Post-doctoral Program of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (PNPD/CAPES; project no. 20132641).

Compliance with ethical standards All experimental practices involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Protocol number 87352511).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest

References

- Akhlaghi M, Razavi M, Hosseini A (2016). Molecular differentiation of bovine sarcocysts. *Parasitol Res* v. 115, p.2721–2728. doi: 10.1007/s00436-016-5020-7.
- Álvarez-García G, García-Lunar P, Gutiérrez-Expósito D, Shkap V, Ortega-Mora LM (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitol* 141, 1419–1435. doi: 10.1017/S0031182014000729.
- Bucca M, Brianti E, Giuffrida A, Ziino G, Cicciari S, Panebianco A (2011). Prevalence and distribution of *Sarcocystis* spp. cysts in several muscles of cattle slaughtered in Sicily, Southern Italy. *Food Control*, v. 22, p. 105-108. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.05.015.
- Dauguschies A, Hintz J, Henning M, Rommel M (2000). Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. *Vet Parasitol* v. 88, p. 7–16. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00192-2.

- Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R (2016). *Sarcocystosis of Animals and Humans*, Second Edition. CRC Press. pp.1-481.
- Ford EG (1986). Role of the dog, fox, cat and human as carnivore vectors in the transmission of the sarcosporidia that affect sheep and meat production. *Aust J Agr Res*, v. 37, p.79-88.
- Fukuyo M, Battsetseg G, Byambaa B (2002). Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 33, p. 490–495.
- García-Lunar P, Moré G, Campero L, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G, (2015). Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Vet Parasitol.*, v. 30, p. 49-54. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.011.
- Ghisleni G, Robba S, Germani O, Scanziani E (2006). Identification and prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in bovine canned meat. *Food Control*, v. 17, p. 691–694. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.04.013.
- Hamidinejat H, Jalali MHR, Gharibi D, Molayan PH (2015). Detection of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Iran by PCR-RFLP. *Journal of Parasitic Disease*, v. 39, p. 658-662. doi: 10.1007/s12639-014-0426-6.
- Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L (2008). Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol Res* 102:671–675. doi: 10.1007/s00436-007-0810-6.
- Moré G, Abrahamovich P, Jurado S, Bacigalupe D, Marin JC, Rambeaud M, Venturini MC (2011). Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet Parasitol* 177:162–165. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.036.
- Ono M, Ohsumi T (1999). Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). *Parasitol Int*, v. 48, p. 91–94. doi:10.1016/S1383-5769(98)00041-5.
- Perftoft H, Johnsson A, Warmegard B, Seljelid R, (1980). Separation of human monocytes on density gradient of Percoll®. *J Immunol Methods*, v.33, p. 221-229.
- Rosenthal BM, Dunams DB, Pritt B (2008). Restricted genetic diversity in the ubiquitous cattle parasite, *Sarcocystis cruzi*. *Infect Genet Evol* v. 8, p. 588–592. doi:10.1016/j.meegid.2008.04.004.
- Ruas JL, Cunha CW, Silva SS (2001). Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Agrociência* v. 7, p. 227-230. doi: HTTP://DX.DOI.ORG/10.18539/CAST.V7I3.402.

Silva NRS, Rodrigues RJD, Araújo FAP, Beck C, Olicheski AT (2002). Detection of bovine *Sarcocystis cruzi* cysts in cardiac muscles: a new technique of concentration for diagnostic. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 30, p. 127-129.

Thrusfield M, (2007). *Veterinary Epidemiology*, Third edition. Wiley, pp. 1-624.

Vangeel L, Houf K, Geldhof P, De Preter K, Vercruyse J, Ducatelle R, Chiers K. (2013). Different *Sarcocystis* spp. are present in bovine eosinophilic myositis. *Vet Parasitol*, v. 197, p. 543–548. doi:10.1016/j.vetpar.2013.06.001.

Table 1. Sensitivity, specificity and Kappa value, comparing IFAT 1:25 and IFAT 1: 200 with direct microscopic examination (gold standard).

Diagnostic method	Sensitivity	Specificity	Kappa
IFAT 1:25	100%	83%	0,89
IFAT 1:200	80%	50%	0,35

5. CAPÍTULO III – Artigo científico

Este capítulo originou um artigo científico a ser submetido para publicação na revista *Veterinary Parasitology*

Performance of *Dot-blot* test for *Sarcocystis* spp antibodies detection

Maiara S.T. Ferreira^a, Marta Elena Machado Alves^a, Luis A. Sangioni^a, Fernanda S.F. Vogel^a

^aLaboratório de Doenças Parasitárias, prédio 44, sala 5149, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. * Corresponding author. E-mail address: matafner@hotmail.com (M.S.T. Ferreira).

Abstract

Serological techniques can detect antibodies against *Sarcocystis* spp., *N. caninum* and *T. gondii* antigens in single or mixed infections. IFAT is considered the gold standard technique for Sarcocystosis diagnostic in cattle serum and a positive IFAT result reflects *Sarcocystis* spp. infection. Therefore, the aims of the present study were to compare IFAT and *Dot-Blot* for sarcocystosis diagnostic in experimentally infected mice and to investigate serological cross-reactions with *N. caninum* and *T. gondii* in these methods. Mice (*Mus musculus*) were inoculated intraperitoneally with bradizoites of *Sarcocystis* spp. or tachyzoites of *N. caninum* or *T. gondii*. Serum samples were obtained and analyzed by IFAT and *Dot-Blot* for the three protozoa. Serum from *N. caninum* and *T. gondii* experimentally infected mice were tested by IFAT and reacted only to *N. caninum* or *T. gondii* antigens, respectively. Specific antibodies against *Sarcocystis* spp. were present in all animals experimentally infected with this protozoan, with IFAT titers from 10 to 800. Serum samples from mice experimentally infected with *Sarcocystis* spp., *N. caninum* and *T. gondii* and tested by *Dot-Blot* demonstrated no cross reaction between protozoa. A *Dot-Blot* using *Sarcocystis* spp. antigen appears to be a good alternative to IFAT in the serological diagnosis of Sarcocystosis.

Keywords: serological diagnosis, IFAT, *Dot-Blot*, protozoan.

1. Introduction

Sarcocystis spp., *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* are coccidians belonging to Sarcocystidae family. They have worldwide distribution and may cause infections in ruminants inducing productive and economic losses (Tenter, 1995; Dubey, 2003; Dubey, 2009). Although the prevalence of *Sarcocystis* spp. infection in cattle herds is approximately 90% to 100% in many countries, Sarcocystosis in cattle are frequently asymptomatic making difficult the diagnosis (Moré et al., 2011; Ruas et al., 2001; Akhlaghi et al., 2016).

Diagnosis of acute Sarcocystosis is difficult because, the clinical signs are uncommon, unspecific and the parasitemia is frequently low and consequently undetectable (Dubey et al., 2016; Ndiritu, 1996). Diagnosis of chronic Sarcocystosis is usually made by conventional laboratorial methods as microscopy, immunoassays and tissue digestion (Cawthorn and Speer, 1990; Fayer and Dubey, 1986; Gajadhar et al., 1987). Several serological methods as immunofluorescent antibody tests (IFAT), enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), and immunoblots (as Western Blot and *Dot-blot*) have been developed for diagnosis the bovine Sarcocystosis (Moré et al., 2008). Serological techniques detect antibodies against the protozoans *Sarcocystis* spp., *N. caninum* and *T. gondii* antigens in single or mixed infections (Uggla et al. 1987; Dubey et al. 1996). However a specific and sensitive serological test which detects acute and chronic infection and suitable for screening a large number of animals is lacking for *Sarcocystis* spp.

Therefore, the aims of the present study were a) to compare two serological tests (IFAT and *Dot-Blot*) for Sarcocystosis diagnostic and b) to check the cross-reactions of *N. caninum* and *T. gondii* using IFAT and *Dot-Blot* in serum of experimentally infected mice.

2. Material and Methods

2.1. Animal inoculation and serum samples

Seven mice (*Mus musculus*), male, approximately 6 weeks of age with initial weight of 30 g, without previous contact with parasites were used to obtain hyperimmune serum against *Sarcocystis* spp., *N. caninum* and *T. gondii*. Two animals were inoculated intraperitoneally with 2×10^5 bradyzoites of *Sarcocystis* spp. obtained from cysts of a naturally infected bovine heart and purified by previously described by García-Lunar et al. (2015). Similarly, two animals were inoculated intraperitoneally with 2×10^5 tachyzoites of *N. caninum* and

two animals with *T. gondii*. Parasites were obtained from culture in VERO cells as described in the item 2.2. After 20 days of infection, blood was collected from cardiac puncture and serum was obtained. One naïve animal was used as a negative experimental control. Samples were identified and stored at -20° C until processing.

2.2. Antigens preparation of sorological tests

Tachyzoites from the NC-1 strain of *N. caninum* (Dubey et al., 1988) and RH-strain of *T. gondii* (Sabin, 1941) were cultured in VERO cells (African Green Monkey kidney cells) in RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Brazil) with 5% CO₂ at 37°C. Tachyzoites from *N. caninum* were obtained after cellular suspension and disruption, and solution was decanted during 30 minutes, at 4°C, in sterile tube to diminish cell debris. Tachyzoites from *T. gondii* were obtained from frozen aliquots and supplemented with RPMI and fetal serum. Supernatant was recovered from each suspension and centrifuged at 1.500 x g for 10 minutes. Tachyzoites were counted using Neubauer's chamber and re-diluted with RPMI to a final concentration of 2x10⁵ tachyzoites/mL. The pellets were stored at -80°C until use for total protein extraction or IFAT (Pinheiro et al., 2005).

Sarcocystis spp. bradyzoites and/or merozoites were obtained from microscopic analysis of myocardium samples from naturally infected cattle and then purified as described by García-Lunar et al. (2015) and then used as antigen (Moré et al., 2011). Briefly, 100 g of minced myocardium were mixed with 400 ml of digestion solution (2.5% pepsin, 1% HCl) and were placed in a magnetic stirrer for 20 minutes at 37°C. The homogenate was filtered using 300 µm gauze into a 50 ml tubes and centrifuged at 500 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was washed in 30 ml of PBS, 13.5 ml of isotonic Percoll® (GE Healthcare) and 1.5 ml saline solution (1.5 M NaCl) and then centrifuged (4.000 x g for 10 min) (Pertoft et al., 1980). The supernatants and the upper layer above the pellet were discarded and the pellet was washed three times with PBS to a final concentration of 2x10⁵ bradyzoites/mL. Pellets with bradyzoites were frozen at -80°C until use for total protein extraction or for their use in IFAT (Moré et al., 2008; Fernandez-García et al., 2009).

2.3. IFAT

Slide preparation and IFAT for *N. caninum* and *T. gondii* were performed as described by Dubey et al. (1988). Bradyzoites of *Sarcocystis* spp. were fixed in slides as described by García-Lunar et al., 2015.

In order to investigate antibodies against *N. caninum* and *T. gondii*, serum samples were used at the dilution of 1/64 (Devens et al., 2014) in phosphate-buffered saline solution (PBS; phosphate 0.1M, NaCl 0.33M,

pH 7.2). Serum samples were analyzed for antibodies against *Sarcocystis* spp. in serial dilutions starting at 1/10, dilution in PBS (Tenter, 1988). A commercial goat anti-mouse IgG fluorescein isothiocyanate conjugate (Sigma Bio Sciences, St. Louis, USA) was used as secondary antibody. Mouse positive and negative sera controls were included on each slide to each parasite. After incubations, slides were observed at 400x magnification under fluorescent microscope (Leica CTR 4000/EBQ 100, Leica Microsystems, Germany) and complete fluorescence of tachyzoites and bradyzoites was considered positive. IFAT were used as a gold standard serologic test, since it presents good sensitivity and specificity to diagnose *Sarcocystis* spp., *N. caninum* and *T. gondii* infections (Moré et al., 2008).

2.4. Total Protein Extraction

Total protein extraction was performed using the Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer (RIPA Buffer – Sigma Bio Sciences, St. Louis, USA) buffer following the manufacturer's recommendations. RIPA Buffer were added (300 µL) were added to the pellets containing *N. caninum*, *T. gondii* tachyzoites, *Sarcocystis* spp. bradyzoites, VERO cells and bovine myocardium. The lysate was centrifuged at 8.000 x g for 10 minutes at 4 ° C to sediment the cellular debris. The supernatant containing the protein solution was carefully transferred to a microtube where 3 µl of protease inhibitor cocktail (Sigma Bio Sciences, St. Louis, USA) was added and stored at -20 ° C until the time of use.

2.5. Dot-Blot

Nitrocellulose membrane with 0.45 µm porosity was used and approximately 12 µg/mL of each parasites purified antigenic protein was distributed. After drying for 20 minutes at room temperature, membranes were washed three times for five minutes under shaking with PBS-T wash solution (0.05% Tween 20 and PBS) and then blocked with blocking solution (PBS-T with 5% non-fat dry milk) for 16 hours at 4 °C. Mice serum samples and negative control serum, were diluted (1/50) in PBS-T and then distributed on the membrane and incubated at 37°C for one hour under slight shaking as previously described (Tenter, 1988; Pinheiro et al., 2005). After incubation, the membrane was washed three times for five minutes and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated produced in goat anti-mouse immunoglobulin G (1/2000, Sigma Bio Sciences, St. Louis, USA) under shaking for 1 hour at 37°C. The enzymatic reaction was revealed with a developing solution (9 mL of 50 mM Tris-HCl, 1 mL of 0.3% Nickel Sulphate, 30 µL of Hydrogen Peroxide, 0.006 g of DAB) (Sigma Bio Sciences, St. Louis, USA) for 20 minutes at room temperature (Pinheiro et al., 2005).

3. Results and Discussion

N. caninum or *T. gondii* experimentally infected mice tested by IFAT for the 3 protozoans (*N. caninum*, *T. gondii* and *Sarcocystis* spp) reacted only to *N. caninum* or *T. gondii* antibodies, respectively. Specific antibodies against *Sarcocystis* spp. were found in two animals experimentally infected only by this protozoan (one animal showed titer of 50 and other animal presented titer of 800 at IFAT). As previously reported, IFAT is considered the gold standard technique for Sarcocystosis serologic diagnostic in cattle and a positive IFAT result reflects *Sarcocystis* spp. infection (Garcia et al., 2008; Moré et al., 2008). Therefore, in the present study was established that IFAT would be the standard technique to be compared with *Dot-Blot* test. Moré et al. (2008) have described IFAT at 1:25 dilution to be a suitable method for diagnosis of Sarcocystosis in cattle.

Serum samples from mice experimentally infected with *Sarcocystis* spp. and tested by *Dot-Blot* demonstrated the presence of antibodies against this protozoan (at 1:50 dilution) but no cross-reactions were observed in the same sample and same dilution against *N. caninum* or *T. gondii*. Only antibodies against *N. caninum* and no serological cross-reactions with *T. gondii* and *Sarcocystis* spp. were detected in serum samples from mice inoculated with *N. caninum*. As well as, no cross-reactions against *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. was observed in serum samples from mice infected by *T. gondii*, showing only specific antibodies against *T. gondii*. These results showed the *Dot-Blot* sensitivity for coccidian immunological diagnostic in mice and suggest this method as a potential serological test for bovine *Sarcocystis* spp. detection.

Although there are no studies that indicate the best experimental model for infection with *Sarcocystis* species that infect cattle, in this study was possible to produce antibodies against *Sarcocystis* spp. in *Mus musculus* mice as demonstrated by the two serological diagnostic tests performed. Animals inoculated with *Sarcocystis* spp. revealed antibodies against this protozoan at *Dot-Blot* technique and showed a high titer of antibodies at IFAT (1:800). *Dot-Blot* proves to be a sensitive test for IgG antibodies against *Sarcocystis* spp. in this study and similar result was observed by Tenter (1988) in mice infected with *Sarcocystis* and in agreement with results described by Ndiritu et. al (1996) in experimentally infected bovine. Tenter (1988) compared *Dot-Blot* with the conventional diagnostic methods ELISA and IFAT for serological detection of *S. muris* in immunized and experimentally infected rodents and demonstrated that *Dot-Blot* was sensitive for detection of IgG in immunized mice showing sensitivity equivalent to ELISA and IFAT using serum from infected animals.

The results of the present study suggest that *Dot-Blot* using *Sarcocystis* spp. antigens present good sensitivity and specificity compared to IFAT and this method should be evaluated using bovine serum samples from naturally infected animals as a possible screening test to detect antibodies against *Sarcocystis* spp. that could be applied into the field and consequently *Dot-Blot* may be used as an alternative to IFAT, the gold standard technique to bovine Sarcocystosis.

IFAT is a technique that requires expensive equipment as fluorescence microscope is laborious, and difficult to interpret requiring trained technicians (Pappas, 1988; Saville et al., 2004). Therefore, diverse serological diagnostic methods have been developed, to make the diagnosis faster and more precise (Moré et al., 2008; Dubey et al., 2015). In addition, the clinical signs of bovine Sarcocystosis when present are non-specific and not always causing visible macroscopic lesions during meat inspection, therefore these serological methods help in infection diagnosis in order to establish disease control measures (Blagojevic et al., 2014). Serological tests also allow the diagnosis of *N. caninum* and *T. gondii*, in individual or mixed infections (Dubey et al., 1996; Moré et al., 2008). Therefore, *Dot-Blot* may be considered as an alternative specific and sensitive method which makes possible to evaluate a large number of samples into the field in order to facilitate the diagnosis of *Sarcocystis* infection in cattle herds (Homdahl et al., 1993; Ndiritu et al., 1996; Guçlu, 2004). Further studies should be employed allowing the standardization of this method for diagnostic of *Sarcocystis* spp. in bovine serum samples from naturally infected animals.

4. Conclusion

Dot-Blot showed same specificity and sensibility as IFAT for immunological diagnostic of *Sarcocystis* spp. in experimentally infected mice and this immunoblot test did not demonstrate serological cross-reactions with *N. caninum* and *T. gondii*.

Compliance with ethical standards All experimental practices involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Protocol number 87352511).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Akhlaghi, M., Razavi, M., Hosseini, A., 2016. Molecular differentiation of bovine sarcocysts. *Parasitol. Res.* 115, 2721–2728.
- Blagojević, B., Antić, D., 2014. Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. *Food Control*, 36, 174 e 182.
- Cawthorn, R.J., Speer, C.A., 1990. *Sarcocystis*: infections and disease of humans, livestock and other hosts. In: P.L. Long (Editor), *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. CRC Press Inc., pp. 91-120.
- Devens, B.A., Vilorio, M.I.V., Silva, C.H.S., Salcedo, J.H.P., 2014. Produção de hibridomas secretores de anticorpos anti-*Neospora caninum* para uso em imunodiagnóstico. *Ciência Animal Brasileira*, 15, 228-233.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193, 1259–1263.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, D.S., Gay, J.M., Baszler, T.V., Blagburn, B.L., Thulliez, P., 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.*, 57, 329–336.
- Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41, 1-16, 2003.
- Dubey, J.P., 2009. *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second edition. CRC Press, pp. 1-336.
- Dubey, J.P., Howe, D.K., Furr, M., Saville, W.J., Marsh, A.E., Reed, S.M., Grigg, M.E., 2015. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet. Parasitol.*, 209, 1-42.
- Dubey, J.P.; Calero-Bernal, R.; Rosenthal, B.M.; Speer, C.A.; Fayer, R. 2016. *Sarcocystosis of Animals and Humans*, Second Edition. CRC Press. pp.1-481.
- Fayer, R.; Dubey, J.P., 1986. Bovine sarcocystosis. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 8, 130-142.
- Fernandez-García, A., Álvarez-García, G., Risco-astillo, V., Aguado-Martínez, A., Marugán-Hernandez, V., Ortega-Mora, L.M., 2009. Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Vet. Parasitol.*, 164, 104-110.

- Gajadhar, A.A., Yates, E.D.G., Allen, J.R., 1987. Association of eosinophilic myositis with an unusual species of *Sarcocystis* in beef cow. *Can. J. Vet. Res.*, 51, 373-378.
- Garcia, J.L., Gennari, M.S., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Headley, S.A., Vidotto, O., Guimarães Junior, J.S., Bugni, F.M., Igarashi, M., 2008. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res.Vet. Sci.*, 84, 237–242.
- García-Lunar, P., Moré, G., Campero, L. Ortega-Mora, L.M., Álvarez-Garcia, G., 2015. Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Vet. Parasitol.*, 30, 49-54.
- Guçlu, F., Aldem-R, O.S., Güler, L., 2004. Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 155, 440-444.
- Holmdahl, O.J., Mathson, J.G., Ugglå, A., Johansson, K.E., 1993. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from *Sarcocystis* spp. *Molecular and Cellular Probes*, 1993, 7, 481-486.
- 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, 2008.
- 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.
- Ndiritu, W., Cawthorn, R.J., Kibenge, F.S.B., Markham, R.J.F., Horney, B.S., Chan, C.B., 1996. Use of genomic DNA probes for the diagnosis of acute sarcocystosis in experimentally infected cattle. *Vet. Parasitol.*, 62, 9-25.
- Pappas, M.G., 1988. Recent Applications of the Dot-ELISA in Immunoparasitology. *Vet. Parasitol.*, 29, 105-129.
- Perftoft, H., Johnsson, A., Warmegard, B., Seljelid, R. 1980. Separation of human monocytes on density gradient of Percoll®. *J. Immunol. Methods*, 33, 221-229.
- Pinheiro, A.M., Costa, M.F., Paule, B., Vale, V., Ribeiro, M., Nascimento, I., Schaer, R.E., Almeida, M.A.O., Meyer, R., Freire, S.M., 2005. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet. Parasitol.*, 130, 73–79.

Ruas, J.L., Cunha, C.W., Silva, S.S., 2001. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Agrociência*, 7, 227-230.

Sabin, A., 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 116, 801–814.

Saville, W.J.A., Dubey, J.P., Oglesbee, M.J., Sofaly, C.D., Marsh, A.E., Elitsur, E., Vianna, M.C., Lindsay, D.S., Reed, S.M., 2004. Experimental infection of ponies with *Sarcocystis fayeri* and differentiation from *Sarcocystis neurona* infections in horses. *J. Parasitol.*, 90, 1487–1491.

Tenter, A.M., 1988. Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Vet. Parasitol.*, 29, 89-104.

Tenter, A.M., 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int. J. Parasitol.*, 25, 1311-1330.

Uggla, A.; Hiali, M.; Lovgren, K., 1987. Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. *Res.Vet. Sci.*, 43, 127–129.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta incidência da infecção por *Sarcocystis* observada em nosso estudo não é uma surpresa, visto que, RUAS et al. (2001) e SILVA et al. (2002) previamente relataram a prevalência de 100% de infecção por *Sarcocystis* spp. em bovinos de uma região vizinha (sul do Rio Grande do Sul). Adicionalmente, MORÉ et al. (2011) descreveu uma prevalência de 99.5% de sarcocistos em amostras de miocárdio bovino da Argentina. Essa infecção pode ser responsável por perdas econômicas na produção bovina (MORÉ et al., 2011; VANGEEL et al., 2013; HAMIDINEJAT et al., 2015). A alta frequência de *S. cruzi* no miocárdio de bovinos pode ser atribuída à rota de infecção que ocorre via digestiva, de onde os parasitos podem ter acesso à circulação sistêmica e alcançar o músculo cardíaco através do sistema venoso (DUBEY et al., 2016; RUAS et al., 2001). Além disso, o livre acesso de carnívoros domésticos e selvagens a fontes de água e pastagem ou outros locais onde os hospedeiros intermediários se alimentam, juntamente com a utilização de cães no manejo de bovinos contribui para a elevada frequência de *S. cruzi* em bovinos. Cães adquirem o parasito pelo consumo de vísceras e carcaças de bovinos (LOPES, 2004; DUBEY & LINDSAY, 2006; RUAS et al., 2001).

Apesar de o exame microscópico direto ser um método de diagnóstico qualitativo e que ainda permanece sendo o teste padrão-ouro para detecção da infecção por *Sarcocystis* devido sua alta sensibilidade, conforme observado neste e em outros estudos, a PCR permite a confirmação da infecção e é uma ferramenta importante para caracterização das espécies e realização de estudos epidemiológicos (MORÉ et al., 2011; BUCCA et al., 2011; VANGEEL et al., 2013). Na maioria das vezes, os sinais clínicos de bovinos com sarcocistose quando presentes, não são específicos e nem sempre causam cistos macroscópicos, visíveis a olho nu durante a inspeção da carne, conseqüentemente, testes sorológicos podem ser auxiliares no diagnóstico da infecção, a fim de, estabelecer medidas de controle para a doença

(BLAGOJEVICK et al., 2014). Como previamente descrito, a RIFI é considerada a técnica padrão-ouro para diagnóstico sorológico de *Sarcocystis* em bovinos e um resultado positivo reflete a infecção pelo protozoário (GARCIA et al., 2008; MORÉ et al., 2008). Porém, a RIFI é uma técnica que requer equipamentos caros, como microscópio de imunofluorescência e necessita de técnicos treinados para leitura e interpretação dos resultados (PAPPAS, 1988; SAVILLE et al., 2004). Assim sendo, diversos métodos de diagnóstico sorológico têm sido desenvolvidos (MORÉ et al., 2008; DUBEY et al., 2015c). O *Dot-Blot* usando antígenos de *Sarcocystis* spp. apresentaram ótima sensibilidade e especificidade, quando comparado à RIFI e maiores estudos deveriam ser realizados para padronização deste método em amostras de soro de bovinos naturalmente infectados com *Sarcocystis* spp., sendo um possível teste de triagem para detecção de anticorpos contra o parasito (GUÇLU, 2004; HOMDAHL et al., 1993; NDIRITU et al., 1996).

Como conclusão dos estudos realizados, no capítulo 1, notamos uma alta frequência de cistos de *Sarcocystis* em amostras de coração bovino, destinados ao consumo humano, na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. A única espécie encontrada nas amostras submetidas à análise molecular foi *S. cruzi*. No capítulo 2, observamos que o exame do tecido a fresco por microscopia óptica confirma ser o teste padrão-ouro para diagnóstico da infecção em bovinos, mas assim como a detecção molecular do DNA do parasito pela PCR, em tecidos-alvo, como o miocárdio, só podem ser realizados após a morte dos animais infectados. Assim, visto que, a RIFI demonstrou boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico de *Sarcocystis*, quando comparada ao exame microscópico direto, parece ser uma ferramenta útil no diagnóstico da infecção em bovinos ainda vivos. Em relação ao diagnóstico sorológico de *Sarcocystis*, observamos no capítulo 3, que o *Dot-Blot* demonstrou mesma sensibilidade e especificidade à RIFI, em soro sanguíneo de camunodongos experimentalmente infectados com o parasito e não apresentou reação sorológica cruzada com *N. caninum* e *T. gondii*.

Portanto, *Dot-Blot* parece ser uma alternativa à RIFI no diagnóstico sorológico de sarcocistose. Desta forma, os estudos sobre métodos de diagnóstico para detecção da infecção por *Sarcocystis* são importantes para identificar adequadamente o parasito envolvido e realização de estudos sobre sua epidemiologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, M. M.; HAJIMOHAMMADI, B., ESLAMI, G.; ORYAN, A.; ARDAKANI, S.A.Y.; ZOHOURTABAR, A.; ZARE, S. First identification of *Sarcocystis hominis* in Iranian traditional hamburger. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, p. 770–772. 2015.

AIMARIA, S.; AMDOUNI, Y.; RIJEIBI, M.R.; ROUATBI, M.; AWADI, S.; GHARBI, M. First molecular detection and characterization of *Sarcocystis* species in slaughtered cattle in North-West Tunisia. **Meat Science**, v. 122, p. 55–59. 2016.

AKHLAGHI, M.; RAZAVI, M.; HOSSEINI, A. Molecular differentiation of bovine sarcocysts. **Parasitology Research**, v.115, p. 2721–2728. 2016.

ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; GARCÍA-LUNAR, P.; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D.; SHKAP, V.; ORTEGA-MORA, L.M. Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. **Parasitology**, v. 141, p.1419–1435. 2014.

BLAGOJEVICK, B. ANTIC, D. Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. **Food Control**, v. 36, p. 174 e 182. 2014.

BONESI, G.L.; YAMAMURA, M.H.; PEREIRA, A.B.L. Experimental infection of dogs with *Sarcocystis* sp. using infected equine muscular tissue. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 31-33, 1999.

BOTELHO, G.G.; LOPES, C.W.G. Doença de Dalmeny: aspectos laboratoriais na infecção experimental de bovinos com *Sarcocystis cruzi* (Hasselmann, 1926) Wenyon, 1926. I. Hematologia Clínica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, p. 13-18, 1988a.

BOTELHO, G.G.; LOPES, C.W.G. Doença de Dalmeny: aspectos laboratoriais na infecção experimental de bovinos com *Sarcocystis cruzi* (Hasselmann, 1926) Wenyon, 1926. II. Bioquímica Clínica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 6, p. 103-106. 1988b.

BÖTTNER, A.; CHARLESTON, W.A.G.; POMROY, W.E.; ROMMEL, M. The Prevalence and Identity of *Sarcocystis* in Beef Cattle in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 157-168. 1987.

BUCCA, M., BRIANTI, E., GIUFFRIDA, A., ZIINO, G., CICCARI, S., PANEBIANCO, S., PANEBIANCO, A. Prevalence and distribution of *Sarcocystis* spp. cysts in several muscles of cattle slaughtered in Sicily, Southern Italy. **Food Control**, v. 22, p. 105-108. 2011.

BUNYARATVEJ, S.; UNPUNYO, P. Combined *Sarcocystis* and grampositive bacterial infections: a possible cause of segmental enterocolitis in Thailand. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 75, p. 38–44. 1992.

CARRIGAN, M.J. An outbreak of sarcocystosis in dairy cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 1, 22-24. 1986.

CHEN, X.; ZUO, Y.; ROSENTHAL, B.M.; HE, Y.; CUI, L.; YANG, Z. *Sarcocystis sinensis* is an ultrastructurally distinct parasite of water buffalo that can cause foodborne illness but cannot complete its life-cycle in human beings. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 35-39. 2011.

COOLEY, W.A.; CLARK, J.K.; RYDER, S.J.; DAVIS, L.A.; FARRELLY, S.S.J.; STACK M.J. Evaluation of a Rapid Western Immunoblotting Procedure for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the UK. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p. 64-70, 2001.

DAUGSCHIES, A.; HINTZ, J.; HENNING, M.; ROMMEL, M. Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p.7 e 16. 2000.

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.; SPEER, C.A.; EPLING, G.P. Sarcocystosis in newborn calves fed *Sarcocystis cruzi* sporocysts from coyotes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 2147-2164. 1982.

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

DUBEY, J.P.; FAYER, R.; SPEER, C.A. Experimental *Sarcocystis hominis* infection in cattle: lesions and ultrastructure of sarcocysts. **Journal of Parasitology**, v. 74, p. 875–879. 1988b.

DUBEY, J.P., C.A., SPEER, FAYER, R. **Sarcocystosis of animals and man**. CRC Press, Boca Ratón, FL, 215 p. 1989a.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; CHARLESTON, W.A.G. Ultrastructural differentiation between sarcocysts of *Sarcocystis hirsute* and *Sarcocystis hominis*. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.153-157. 1989b.

DUBEY, J.P., UDTUJAN, R.M., CANNON, L., LINDSAY, D.S. Condemnation of beef because of *Sarcocystis hirsute* infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 1095–1096. 1990.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADAMS, D.S.; GAY, J.M. BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B.L.; THULLIEZ. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 329-336. 1996.

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

DUBEY, J.P.; FAYER, R.; ROSENTHAL, B.M.; CALERO-BERNAL, R.; UGGLA, A. Identity of *Sarcocystis* species of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos taurus*) and the suppression of *Sarcocystis sinensis* as a nomen nudum. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 1-6. 2014.

DUBEY, J.P. Foodborne and waterborne zoonotic sarcocystosis. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 1, p. 2-11, 2015.

DUBEY, J.P.; MORÉ, G.; VAN WILPE, E.; CALERO-BERNAL, R.; VERNA, S.K.; SCHARES, G. *Sarcocystis rommeli*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from cattle (*Bos taurus*) and its differentiation from *Sarcocystis hominis*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 0, p. 1-7, 2015a.

DUBEY, J.P.; VAN WILPE, E.; CALERO-BERNAL, R.; VERMA, S.K.; FAYER, R. *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Protozoa) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. **Parasitology Research**, v. 114, p. 4143–4147, 2015b.

DUBEY, J.P.; HOWEB, D.K.; FURRC, M., SAVILLED, W.J.; MARSHD, A.E.; REEDE, S.M.; GRGGFA, M.E. J.P. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 1-42, 2015c.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M., SPEER, C.A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of Animals and Humans**, Second Edition. CRC Press. pp.1-481. 2016.

FAYER, R.; LEEK, R.G. *Sarcocystis* transmitted by blood transfusion. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 6, p. 890-893, 1979.

FAYER, R.; LYNCH, G.P.; LEEK, R.G.; GASBARRE, L.C. Effects of sarcocystosis on milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 4, p. 904-908, 1983.

FAYER, R. *Sarcocystis* spp. in human infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 894-902. 2004.

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

FUKUYO, M.; BATTSEG, G.; BYAMBAA, B. Prevalence of Sarcocystis infection in meat-producing animals in Mongolia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 33, p. 490-495. 2002.

GANSTROM, D.E.; RIDLEY, R.K.; BAOAN, Y.; GERSHWIN, L.J. Immunodominant proteins of *Sarcocystis cruzi* bradyzoites isolated from cattle affected or nonaffected with eosinophilic myositis. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, p. 1151-1155. 1990.

GARCIA, J.L.; GENNARI, M.S.; NAVARRO, I.T.; MACHADO, R.Z.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O.; GUIMARÃES JUNIOR, J.S.; BUGNI, F.M.; IGARASHI, M. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 237-242. 2008.

GARCÍA-LUNAR, P.; MORÉ, G.; CAMPERO, L. ORTEGA-MORA, L.M.; ÁLVAREZ-GARCIA, G. Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence serological diagnosis of bovine besnoitiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 49-54. 2015.

GARDINER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. **An atlas of protozoan parasites in animal tissues**. 2. ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1998. 83p.

GESTRICH, R.; HEYDORN, A.-O.; BAYSU, N. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. VI. Untersuchungen zur Artendifferenzierung bei *Sarcocystis fusiformis* und *Sarcocystis tenella*. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal**, v.88, p. 191-197 e 201-204. 1975a.

GESTRICH, R.; MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.O. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten der großen Form von *Isospora bigemina* der Katze Zbl Bakt I. **Abt Originale A**, v. 233, p. 261-276. 1975b.

GHISLENI, G.; ROBBA, S.; GERMANI, O.; SCANZIANI, E. Identification and prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in bovine canned meat. **Food Control**, v.17, p.691-694. 2006.

GJERDE, B. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. **International Journal for Parasitology**, v.43, p.579–591. 2013.

GJERDE, B. The resurrection of a species: *Sarcocystis bovifelis* Heydorn, et al., 1975 is distinct from the current *Sarcocystis hirsuta* in cattle and morphologically indistinguishable from *Sarcocystis sinensis* in water buffaloes. **Parasitology Research**, v. 115, p. 1-21. 2016a.

GJERDE, B. Molecular characterization of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos Taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Parasitology Research**, v. 115, p. 1473-1492. 2016b.

GUÇLU, F.; ALDEM_R, O.S.; GÜLER, L. Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 155, p. 440-444. 2004.

HAMIDINEJAT, H.; JALALI, M.H.R., GHARIBI, D.; MOLAYAN, P.H. Detection of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Iran by PCR-RFLP. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, p. 658-662. 2015.

HAWKES, R., NIDAY, E., GORDON, J. A dot Immunoblotting assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 119, p. 142-147. 1982.

HEYDORN, A.O. Sarkosporidieninfiziertes Fleisch als mögliche Krankheitsursache für den Menschen **Arch Lebensmittelhygiene**, v. 28, p. 27–31, 1977.

HOLMDAHL, O.J.; MATHSON, J.G.; UGGLA, A.; JOHANSSON, K.E. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from *Sarcocystis* spp. **Molecular and Cellular Probes**, 1993, v.7, p.481-486. 1993.

IMES, G.D.; MIGAKI, G. Eosinophilic myositis in cattle-pathology and incidence. In: Proceedings of the 71st **Annual Meeting** of the US Livestock Sanitary Association. p. 111–112. 1967.

JEHLE, C.; DINKEL, A.; SANDER, A.; MORENT, M.; ROMIG, T.; LUC, P.V.; DE, T.V.; THAI, V.V.; MACKENSTEDT, U. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 314–320. 2009.

JENSEN, R.; ALEXANDER, A.F.; DALGHREN, R.R.; JOOLEY, W.R.; MARQUARDT, W.C.; FLACK, D.E.; BENNETT, B.W.; COX, M.F.; HARRIS, C.W.; HOFFMAN, G.A.;

TROUTMAN, R.S.; HOFF, R.L.; JONES, R.L., COLLINS, J.K.; HAMAR, D.W.; CRAVANS, R.L. Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 587–593. 1986.

KHIEU, V.; MARTI, H.; CHHAY, S.; CHAR, M.C.; MUTH, S.; ODEDMATT, P. First report of human intestinal sarcocystosis in Cambodia. **Parasitology International**, v. 66, p. 560–562. 2017.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**. v. 38, p. 283-293, 2006.

LANKESTER, E. R. On *Drepanidium ranarum*, the cellparasite of the frog's blood and spleen (Gaule's Wiirmschen). **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 22, p. 53-65. 1882.

LATIF, B.; AZDAYANTI, M. Human and animal sarcocystosis in Malaysia: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, p. 982–988. 2016.

LIAN, Z.; MA, J.; WANG, Z.; FU, L.; ZHOU, Z.; LI, W.; WANG, X. Studies on man-cattle-man infection cycle of *Sarcocystis hominis* in Yunnan. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases**, v.8, p50–53, 1990.

LINDSAY, D.; BLAGBURN, B., BRAUND, K. *Sarcocystis* spp. and sarcocystosis. **European Journal of Translational Myology**, v. 5, p. 249-254. 1995.

LOPES, C.W.G. O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (Apicomplexa: Sarcocistidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13. 2004.

MACPHERSON, J.M. & GAJADHAR, A.A. Specific amplification of *Sarcocystis cruzi* DNA using a randomly primed polymerase chain reaction assay. **Veterinary Parasitology**, v. 55, p. 267-277. 1994.

MACPHERSON, C.N. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1319–1331. 2005.

MEHLHORN, H.; HEYDORN, A.-O. GESTRICH, R. Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten von *Isospora hominis* Railliet et Lucet, 1891. 1. Zur Entstehung der Cyste und der Cystenwand. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A**, v.231, p.301-322. 1975a.

MEHLHORN, H., HEYDORN, O.; GESTRICH, R. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten der großen Form von *Isospora bigemina* des Hundes. 1. Zur Entstehung der Cyste und der "Cystenwand". *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A*, v. 232, p.392–409. 1975b.

MEHLHORN, H.; SENAUD, J., HEYDORN, A.O.; GESTRICH, R. Comparaison des ultrastructures des Kystes de *Sarcocystis fusiformis* Railliet, 1897 dans la musculature du boeuf, après infection naturelle et après infection expérimentale par des sporocystes d'*Isospora hominis* et par des sporocystes des grandes formes d'*Isospora bigemina* du chien et du chat. *Protistologica*, v.11, p.445–455. 1975c.

MEHLHORN, H.; HARTLEY, W.J.; HEYDORN, A.O. A comparative study of the cyst wall of 13 *Sarcocystis* species. *Protistologica*, v.12, p.451–467. 1976.

MIESCHER, E. Über eigenthümliche schläuche in den muskeln einer hausmaus. *Berl. Verh. Naturforsch. Ges. Basel.*, v.5, p. 198-202, 1843 apud (1843 apud LEVINE, N.D., 1977, p.38-51).

MORÉ, G.; BASSO, W.; BACIGALUPE, D.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitology Research*, v. 102, p.671–675, 2008.

MORÉ, G.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; RAMBEAUD, M.; BELTRAME, F.; RAMIREZ, B.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 160, p. 51–54. 2009.

MORÉ, G.; ABRAHAMOVICH, P.; JURADO, S.; BACIGALUPE, D.; MARIN, J.C.; RAMBEAUD, M.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 177, p. 162–165, 2011.

MORÉ, G. SCHARESA, S., MAKSIMOVA, FRANZ, J., CONRATHSA, M., VENTURINI, C., SCHARES, G. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 197, p. 85– 94. 2013.

MORÉ, G.; PANTCHEV, A.; SKUBALLA, J.; LANGENMAYER, M.C.; MAKSIMOV, M.C.; CONRATHS, F.J.; VENTURINI, M.C.; SCHARES, G. *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. *Parasitology Research*, v. 113, p. 2223–2230. 2014.

NDIRITU, W.; CAWTHORN, R.J.; KIBENGE, F.S.B.; MARKHAM, R.J.F.; HORNEY, B.S.; CHAN, C.B. Use of genomic DNA probes for the diagnosis of acute sarcocystosis in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 9-25. 1996.

NG, Y. H.; SUBRAMANIAM, V.; LAU, Y.L. Modified use of methylene blue in the tissue compression technique to detect sarcocysts in meat-producing animals. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p. 200-203. 2015.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. **Risk-based meat inspection in a Nordic context**. In TemaNord, v. 585, p. 1 e 159. 2006.

NOURANI, H.; MATIN, S.; NOURI, A.; AZIZI, H. Prevalence of thin-walled *Sarcocystis cruzi* and thick-walled *Sarcocystis hirsuta* or *Sarcocystis hominis* from cattle in Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1225–1227. 2010.

ONO, M.; OHSUMI, T. Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). **Parasitology International**, v. 48, p. 91–94. 1999.

PAPPAS, M.G. Recent Applications of the Dot-ELISA in Immunoparasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 29, p. 105-129. 1988.

PEREIRA, M.J.S.; LOPES, C.W.G. The crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) as a final host for *Sarcocystis capracanis* (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 5, n. 2, p. 233-235, 1982.

PENA, H.F.J.; OGASSAWARA, S.; SINHORINI, I.L. Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of São Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1459-1465. 2001.

PEZZAT, M. M. Frequência de *Sarcocystis* spp. em corações de bovinos. **Veterinária Mexico**, v.2, p. 6-11. 1971.

PRAKAS, P. & BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, p. 1. 2012.

PRAYSON, B.; McMAHON, J.T.; PRAYSON, R.A. Fast food hamburgers: what are we really eating? **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 406–409. 2008.

ROBERTSON, L.J. & GJERDE, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1793–1798. 2001

ROBERTSON, L.J.; SPRONG, H.; ORTEGA, Y.R.; VAN DER GISSEN, J.W.B., FAYER, R. Impacts of globalisation on foodborne parasites. **Trends in Parasitology**, v.30. p. 37-52. 2014.

RUAS, J.L.; CUNHA, C.W.; SILVA, S.S. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente saudáveis, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, p. 227-230, 2001.

SAITO, M.; SHIBATA, Y.; AZUMA, H.; ITAGAKI, H. Distribution of *Sarcocystis cruzi* cysts in bovine striated muscles. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.51, p.453 e 455. 1998.

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

SAVINI, G., ROBERTSON, I.D., DUNSMORE, J.D. Sensitivities and specificities of two ELISA tests for detecting infection with *Sarcocystis* in cattle of Western Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v.32, p.35-40. 1997.

SCANZIANI, E., LAVAZZA, A., SALVI, S. Incidenza della sarcosporidiosi in bovini macellati a Milano. **Summa**, v.5, p.197–200. 1988.

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

SHKAP, V.; RESKE, A.; PIPANO, E.; FISH, L.; BASZLER, T. Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 35–43. 2002.

SILVA, N.R.S.; RODRIGUES, R.J.D.; ARAÚJO, F.A.P.; BECK, C.; OLICHESKI, A.T. Detection of bovine *Sarcocystis cruzi* cysts in cardiac muscles: a new technique of concentration for diagnostic. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, p. 127-129. 2002.

SMITH, K.F.; BEHRENS, M.D., SAX, D.F. Local scale effects of disease on biodiversity. **Ecosyst. Health**, v. 6, p. 287–295. 2009a.

SMITH, K.F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A.B. The role of infectious diseases in biological conservation. **Animal Conservation Journal**, v.12, p.1–12. 2009b.

TALMI-FRANK, D.; STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BANETH G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative *Western Blot* analysis and antigenspecific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 271–276, 2006.

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

THOMPSON, R.C.A., LYMEBRY, A.J.; SMITH, A. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1163–1170. 2010.

THOMPSON, R.C.A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 1079–1088. 2013.

UGGLA, A.; HIALI, M.; LOVGREN, K. Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. **Research in Veterinary Science**, v. 43, p. 127–129. 1987.

UGGLA, A.; BUXTON, D. Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: Diagnosis and prospects for vaccination. **Revue Scientifique et Technique, International Office des Epizooties**, v. 9, p. 441-462. 1990.

VANGEEL, L.; HOUF, K.; GELDHOF, P.; NOLLET, H.; VERCRUYSSSE, J.; DUCATELLE, R.; CHIERS, K. Intramuscular inoculation of cattle with *Sarcocystis* antigen results in focal eosinophilic myositis. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 224–230. 2012.

VANGEEL, L., HOUF, K., GELDHOF, P., DE PRETER, K., VERCRUYSSSE, J., DUCATELLE, R., CHIERS, K. Different *Sarcocystis* spp. are present in bovine eosinophilic myositis. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 543– 548. 2013.

VERCRUYSSSE, J.; FRANSEN, J.; VAN GOUBERGEN, M. The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin**, v. 36, p. 148–153. 1989.

WOLDEMESKEL, M.; GEBREAB, F. Prevalence of *Sarcocystis* in livestock of northwest Ethiopia. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin B**, v. 43, p.55–58. 1996.

WOUDA, W., SNOEP, J.J., DUBEY, J.P. Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 249–253. 2006.

XIANG, Z., CHEN, X., YANG, L., HE, Y., JIANG, R., ROSENTHAL, B.M., LUAN, P., ATWOOD, S.W., ZUO, Y., ZHANG, Y., YANG, Z. Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. **Parasitology International**, v. 58, p. 293–296. 2009.

XIANG, Z., HE, Y., ZHAO, H., ROSENTHAL, B.M., DUNAMS, D.B., LI, X., ZUO, Y., FENG, G., CUI, L., YANG, Z. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 460–466. 2011.

YANG, Z.Q., ZUO, Y.X., DING, B., CHEN, X.W., LUO, J., ZHANG, Y.P. 18S rRNA gene of *Sarcocystis hominis* cyst from water buffalo and cattle. **Zoology Research**, v. 21, p. 133–138. 2000.

YANG, Z.Q., LI, Q.Q., ZUO, Y.X., CHEN, X.W., CHEN, Y.J., NIE, L., WEI, C.G., ZEN, J.S., ATTWOOD, S.W., WHANG, X.Z., ZHANG, Y.P. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique or routine species identification. **Experimental Parasitology**, v. 102, p. 212–217. 2002.

ZOLL, W.M.; NEEDLE, D.B.; FRENCH, S.J.; LIM, A.; BOLIN, S.; LANGOHR, I.; AGNEW, D. *Sarcocystis* spp. Infection in two Red Panda Cubs (*Ailurus fulgens*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, p. 185e189. 2015.

ZUO, Y.X. Coccidians in Livestock and Birds and Human Coccidiosis. **Science and Technology Publishing Company of Tianjin**, p.356–357, 1992.

ANEXOS

Artigo científico publicado na revista *Semina: Ciências Agrárias*

Neospora spp. and *Toxoplasma gondii* infection in sheep flocks from Rio Grande do Sul, Brazil

Infecção por *Neospora* spp. e *Toxoplasma gondii* em rebanhos ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil

Maiara Sanitá Tafner Ferreira^{4*}, Fernanda Silveira Flores Vogel², Luis Antonio Sangioni², Alfredo Skrebsky Cezar³, Fernanda Rezer de Menezes⁴

Abstract

Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* are coccidian parasites (protozoa: Apicomplexa) that cause reproductive losses in ruminants. Although, in sheep, abortion is generally related to *T. gondii*, potential damage caused by *N. caninum* must be considered. The aims of this study were to evaluate the frequencies of antibodies against *Neospora* spp. and *T. gondii*, and to identify the risk factors related to neosporosis and toxoplasmosis in sheep from ten flocks located in Central-Western, Northwestern, Southwestern, and Southeastern mesoregions of the Rio Grande do Sul state, southern Brazil. Blood samples were collected from 300 sheep (30 per flock) and an epidemiological questionnaire was completed by the farmers. The presence of canids, felids, and rodents, the sources of water for the animals, and their reproductive history were investigated as potential epidemiological factors related to the studied infections. Serum samples were tested by the indirect fluorescent antibody test for the presence of antibodies against *Neospora* spp. (cutoff 1:50) and *T. gondii* (cutoff 1:64), with respective frequencies detected being 16.3% (49/300) and 41.3% (124/300). Seropositivity to both parasites was observed in 8% (24/300) of the animals. *Neospora* spp. and *T. gondii* were present in 90% (9/10) and 100% (10/10) of the flocks, respectively. The presence of cats in the pastures, pens, and barns was significantly associated ($p=0.047$) with high frequencies (53.3% to 70%)

⁴ Discente de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, na área de Medicina Veterinária Preventiva, Santa Maria, RS, Brasil. Bolsista CAPES. E-mail: matafner@hotmail.com

² Docentes do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: fefevogel@gmail.com; lasangioni@gmail.com.

³ Aluno de pós-doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Economia & Desenvolvimento (PPGE&D), Departamento de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Programa Nacional de Pós-Doutorado. Bolsista PNPd/CAPES. E-mail: alfredosps@hotmail.com

⁴ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria, RS, Brasil. Bolsista CAPES. E-mail: fernandarezer@gmail.com

*Autor para correspondência

of antibodies against *T. gondii* in the flocks. However, no associations were detected ($p>0.05$) between each of the other risk factors and the frequency of antibodies against *Neospora* spp. or *T. gondii*. Results of this study showed a broad distribution of both protozoa in evaluated sheep flocks.

Key words: antibodies, epidemiological survey, neosporosis, toxoplasmosis, serology, IFAT.

Resumo

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são parasitos coccídeos (protozoa: Apicomplexa) que causam perdas reprodutivas em ruminantes. Embora o aborto em ovinos geralmente esteja associado a *T. gondii*, potenciais perdas causadas por *N. caninum* devem ser consideradas. Os objetivos deste estudo foram avaliar as frequências de anticorpos contra *Neospora* spp. e *T. gondii* e identificar fatores de risco para neosporose e toxoplasmose em ovinos de dez rebanhos localizados nas mesorregiões Centro-Ocidental, Noroeste, Sudoeste e Sudeste, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletadas amostras de soro sanguíneo de 300 ovinos (30 por rebanho) e foi aplicado inquérito epidemiológico aos proprietários dos rebanhos. A presença de canídeos, felídeos e roedores, as fontes de água dos animais, e seu histórico reprodutivo, foram investigados como potenciais fatores epidemiológicos relacionados às infecções estudadas. As amostras de soro foram testadas pela técnica de imunofluorescência indireta para presença de anticorpos contra *Neospora* spp. (ponto de corte 1:50) e *T. gondii* (ponto de corte 1:64), sendo encontradas frequências de 16,3% (49/300) e de 41,3% (124/300), respectivamente. Soropositividade para ambos os agentes foi observada em 8% (24/300) dos animais. *Neospora* spp. e *T. gondii* estavam presentes em 90% (9/10) e 100% (10/10) dos rebanhos, respectivamente. A presença de gatos nas pastagens, currais e depósitos esteve significativamente associada ($p=0,047$) com altas frequências de anticorpos (entre 53,3% a 70%) contra *T. gondii* nos rebanhos. Não houve associação ($p>0,05$) entre os demais fatores de risco e a frequência de anticorpos contra *Neospora* spp. ou *T. gondii*. Os resultados deste estudo demonstraram ampla distribuição de ambos os protozoários nos rebanhos ovinos avaliados.

Palavras-chave: anticorpos, inquérito epidemiológico, neosporose, toxoplasmose, sorologia, RIFI.

Introduction

Neosporosis and toxoplasmosis are diseases caused by the coccidian protozoa *Neospora* spp. (*N. caninum* and *N. hughesi*) and *Toxoplasma gondii*, respectively, which are obligate intracellular parasites that belong to the phylum Apicomplexa (DUBEY, 2003, 2009). Cats are definitive hosts of *T. gondii*, which causes major losses in sheep production due to reproductive disorders, such as abortion, fetal abnormalities, stillbirth, weakness, and neurological signs in newborn lambs (DUBEY et al., 1990; BÁRTOVÁ et al., 2009). Furthermore, toxoplasmosis is an important zoonotic disease (DUBEY, 2009).

Canids are definitive hosts of *N. caninum* that often causes neosporosis in dogs and cattle (DUBEY et al., 2007). However, *N. caninum* can cause reproductive disturbances in sheep, in a

similar way to toxoplasmosis (DUBEY; LINDSAY, 1990). Nevertheless, infection by *N. caninum* is less frequent in sheep than in cattle (KOBAYASHI et al., 2001; SOARES et al., 2009; UENO et al., 2009).

In Brazil, infection rates found for both parasites in naturally exposed sheep are variable, depending on the flock's management (SOARES et al., 2009). Epidemiological studies regarding these parasites in sheep are commonly based on serological diagnosis, but different techniques and cutoffs can be used for positive sample identification (FIGLUOLO et al., 2004). The recent resumption in Brazilian sheep production reinforces the importance of studies on diseases, such as neosporosis and toxoplasmosis, which can cause major economic losses to sheep farms (MUNHÓZ et al., 2010).

The aims of this study were to assess the frequency of antibodies against *Neospora* spp. and *T. gondii*, and to identify risk factors associated with infection by these parasites, in sheep flocks located in Rio Grande do Sul, Brazil.

Material and Methods

Blood samples were collected from 300 clinically healthy ewes, raised in extensive systems in ten farms, named Flock A to J (30 animals/farm), located in Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil, in the following counties: Santa Maria (two farms), Vila Nova do Sul (two farms), São Martinho da Serra, and São Sepé, within the Central-Western mesoregion (RS); Caçapava do Sul, within the Southeastern mesoregion (RS); São Gabriel, and Dom Pedrito, within the South-Western mesoregion (RS); and Bossoroca, within the North-Western mesoregion (RS) (see Figure 1). Blood samples were obtained by jugular venipuncture into vacutainer tubes, and transported in cooled boxes to the laboratory. Serum samples were obtained after blood centrifugation (1000 rpm, 10 min), and stored (-20°C) until Immunofluorescent Antibody Tests (IFAT) for detection of antibodies to *Neospora* spp. and *T. gondii* were completed.

The IFAT reactions were performed in slides covered by *N. caninum* (NC-1 strain) or *T. gondii* (RH strain) tachyzoites, and fluorescein-conjugated anti-sheep IgG© (Sigma, St Louis, MO, USA) was used as secondary antibody. However, the diagnosis was expressed for the genus *Neospora* spp. due to serological cross-reactivity between *N. caninum* and *N. hughesi* (GONDIM et al., 2009). Serum samples were diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS; phosphate 0.1M, NaCl 0.33M, pH 7.2). Positive and negative sheep serum samples were used as controls for IFAT to each parasite. Slides were examined using a fluorescence microscope under a 400x magnification (Leica CTR 4000/ EBQ 100, Leica Microsystems GmbH, Germany). Dilution cutoffs used were 1:50 for *Neospora* spp. (DUBEY et al., 1996) and 1:64 for *T. gondii* (OPEL et al., 1991; GARCIA et al., 1999).

An epidemiological survey assessing the presence of canids, felids and rodents, the kinds of water sources for the animals, and the history of reproductive problems in the flocks, was performed to

identify risk factors related to infection by *N. caninum* and *T. gondii*. These data were used to assess the possible influence of searched risk factors on the frequency of antibodies against *Neospora* spp. and *T. gondii* in sheep. The frequency of seropositive sheep per farm was compared by the Chi-square test (95% confidence interval) regarding each parasite. Thus, all ten flocks were classified into upper, intermediate, or lower strata, which were categorized according to the frequency of antibodies against *Neospora* spp. (Figure 2), or *T. gondii* (Figure 3). Association between risk factors and the frequencies of antibodies against *Neospora* spp. or *T. gondii* were evaluated by comparing the frequencies of each risk factor in the flocks within upper, intermediate, and lower strata by the Fisher's exact test (95% confidence interval).

All procedures involving experimentation with animals were performed under veterinarian supervision, and in accordance with the project approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process #069/2014).

Results

Considering all the 300 samples evaluated, 16.3% (49/300) were positive to *Neospora* spp., with seropositive sheep in 90% (9/10) of the farms, and 41.3% (124/300) were positive to *T. gondii*, which was detected in 100% of the farms (10/10). Only 8% (24/300) of sheep were seropositive for both parasites.

Figure 2 shows the frequency of antibodies against *Neospora* spp. in each flock. Flocks B, C, F constituted the upper stratum, due to their significantly higher infection frequencies in comparison to the lower stratum flocks I, H, E ($p < 0.05$). Flocks A, G, J, D showed intermediate infection frequencies, with no significant difference to the upper and lower strata.

Frequencies of antibodies against *T. gondii* (Figure 3) were higher ($p < 0.05$) in flocks G, B, A, I (upper stratum) than in flocks E, F, D (lower stratum). Intermediate infection rates were found in the flocks J, C, H, with no significant difference to the upper and lower strata.

Epidemiological factors and the infection frequencies by *Neospora* spp. and *T. gondii* in each farm are described in the Table 1. Dogs and cats, with free access to water sources, pastures, corrals and feed deposits, were present in 100% (10/10) and 50% (5/10) of the farms, respectively. Wild rodents in deposits of feed, pens or barns, besides wild canids and felids accessing pastures and feed or hay deposits, were reported in 90% (9/10) of the farms. Sheep's water supplies were from weirs (80%; 8/10) or streams (30%; 3/10). Reproductive problems, such as abortion, stillbirth, mummified fetuses, or birth of weak lambs, were reported in 30% (3/10) of the flocks. The higher frequencies of antibodies against *T. gondii* in the upper stratum flocks G, B, A, I was significantly associated ($p = 0.047$) with the higher frequency of cats present in these flocks, in comparison to the lower stratum flocks E, F, D (see the Table 1). On the other hand, none significant association between each of the other epidemiological factors and the frequency of antibodies against *Neospora* spp. or *T. gondii* in sheep was detected ($p > 0.05$).

Discussion

Neospora spp. and *T. gondii* seropositive sheep were found, respectively, in 90% (9/10, exception being farm E) and 100% (10/10) of the flocks. However, a higher frequency of seropositivity ($p = 0.0001$) to *T. gondii* (41.3%, 124/300) was found in comparison to *Neospora* spp. (16.3%, 49/300), considering all the sheep tested. Simultaneous presence of antibodies against both parasites was detected in 8% (24/300) of the sheep. This low frequency could be considered noticeable if compared to the 3.5% found in a similar study in the state of Sao Paulo, Brazil (FIGLUOLO et al., 2004). Prevalence studies, demonstrating the susceptibility of sheep to these protozoa, show infection rates from 0 to 64.2% for *Neospora* spp., and from 6.3% to 100% for *T. gondii* (DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY, 2003; TEMBUE et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013; MOURA et al., 2014). Infection rates range depending on the diversity of epidemiological factors that occur in each flock (SOARES et al., 2009). Serological data comparable to those found in this study have been described in sheep flocks in other regions of Brazil.

Neospora spp. was detected in 91.7% (11/12) of the farms evaluated in the Sao Paulo state (LANGONI et al., 2011). In the Paraná state, *Neospora* spp. was found in 88.9% (8/9) of the farms (ROMANELLI et al., 2007), and in 81.8% (9/11) of the farms, with infection rates ranging from 0 to 32.3% (MUNHÓZ et al., 2010). In contrast, only 42.4% (39/92) of the farms had *Neospora* spp. seropositive sheep, with seroprevalence rates from 0 to 40%, in a study performed in the Plateau region of Santa Catarina state (MOURA et al., 2014).

Compared to *Neospora* spp. serological surveys in sheep from other Brazilian regions, the overall frequency of seropositivity (16.3%, 49/300, 1:50 cutoff) observed in the present study was similar to: 13.1% (64/488) found from 63 municipalities of Minas Gerais state (ANDRADE et al., 2012); 13.2% (105/795) which included 31 farms from nine counties located in the southeastern region of the Bahia state (ROCHA et al., 2014); and 13.9% (53/381) in 11 flocks from the Paraná state (MUNHÓZ et al., 2010). However, lower seroprevalences have been found using the same diagnostic technique, such as: 7% (92/1308) in the Plateau region of the Santa Catarina state (MOURA et al., 2014); 8.75% (90/1028) at Federal District (UENO et al., 2009); 9.2% (55/597) at São Paulo state (FIGLUOLO et al., 2004); 9.5% (29/305) at Paraná state (ROMANELLI et al., 2007), and only 1.8% from the Mossoró municipality, Rio Grande do Norte state (SOARES et al., 2009). On the other hand, higher seroprevalences were reported from Mato Grosso do Sul state, with rates of 29% (41/141) (ANDREOTTI et al., 2009) and 33.7% (140/416) (OSHIRO et al., 2015); Minas Gerais state, 47.1% (73/155) (ROSSI et al., 2011); and Pernambuco state, 64.2% (TEMBUE et al., 2011).

Neospora spp. infection frequencies from 0 to 33.3% were found in the studied flocks (Figure 2). Similar rates, from 2.5 to 25.8%, were reported from Santa Catarina state flocks (DALLA ROSA et al., 2011). However, seroprevalence ranging from 20 to 69.2% was detected in the Mato Grosso do Sul state (OSHIRO et al., 2015). Studies indicate that such variations can result from differences

related to factors as: flock management, water sources, presence (or quantity) of dogs on the farm, farm size, climatic conditions, presence of other animal species on grazing areas, animals' origin, age and breed, and veterinary supervision (ROSSI et al., 2008; DALLA ROSA et al., 2011; MOURA et al., 2014).

The presence of antibodies against *T. gondii* in 100% of the farms indicates the relevance of this parasite in the flocks studied, as described in other regions of Brazil (SAKATA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013). Widely variable frequencies of *T. gondii* seropositive sheep were found (10 - 70%) within each of the ten flocks studied (Figure 3), as reported in Paraná state (28.6 - 84%) (ROMANELLI et al., 2007). Moreover, the overall frequency of *T. gondii* seropositive sheep in the present study (41.3%, 124/300, 1:64 cutoff) was similar to 46.5% (72/155) that was reported in Uberlândia county, Minas Gerais state (ROSSI et al., 2011). However, other studies have shown higher frequencies in Brazil: 56.9% (205/360) at Lages county, Santa Catarina state (SAKATA et al., 2012); 51.5% (157/305) at Paraná state (ROMANELLI et al., 2007); 52% (254/488) at Jaboticabal microregion, São Paulo state (LOPES et al., 2010); and 60.8% (97/305) at Fernando de Noronha archipelago, Pernambuco state (COSTA et al., 2012). On the other hand, lower (but remarkable) frequencies were detected at Central region of São Paulo state (34.7%; 207/597) (FIGLUOLO et al., 2004), also at the states of Alagoas (32.9%; 142/432) (PINHEIRO JR. et al., 2009), Bahia (30.2%; 240/795) (GUIMARÃES et al., 2013), and Sergipe (28.2%; 263/932) (MENDONÇA et al., 2013), and at the Mossoró county, Rio Grande do Norte state (20.8%; 85/409) (SOARES et al., 2009).

Variations in infection rates among flocks indicate that differences related to animals' management and the presence or absence of specific risk factors may be influencing the occurrence of toxoplasmosis. Thus, some factors can be considered, such as vertical transmission of *T. gondii* and the presence of felids and rodents with access to food deposits, barns, corrals, and pastures. Likewise, improper disposal of carcasses and abortion debris facilitates the infection of cats by *T. gondii*, and its consequent horizontal transmission to sheep and humans (WEISS, 2007; DUBEY, 2009; FILHO et al., 2010).

Another factor that may be influencing the transmission of *T. gondii* and *N. caninum* is the variable risk of contamination of water sources as fountains, weirs, dams, and streams, with oocysts excreted in the feces of definitive hosts. Furthermore, the contact with wild canids and felids from woods next to the farms can favor infection of the flock (BLOOD; RADOSTITS, 1991). In the present study, the presence of wild canids and felids was reported by 90% of the owners. These factors, combined with carelessness or lack of knowledge about hygiene of facilities and about disposal of carcasses and fetal-placental debris, can increase *T. gondii* transmission. As indicated by our results, other studies showed that contact with cats increases the risk of toxoplasmosis in sheep (ANDRADE et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013; MENDONÇA et al., 2013). Therefore, adoption of preventive measures to avoid contamination of the sheep's food and water by cat feces, and to restrict the access of carnivores to sheep carcasses and placental/fetal debris after lambing/abortion, can reduce the risks

of *T. gondii* transmission to cats, humans and sheep, and can reduce reproductive disorders in the flock.

As observed by Figuolo et al. (2004) and Dalla Rosa et al. (2011), the relationship between the presence of dogs and *N. caninum* infection rates could not be assessed, due to the presence of dogs in 100% (10/10) of the farms. Furthermore, it was suggested that the maintenance of neosporosis in sheep flocks may be mainly due to vertical (transplacental) transmission, similarly to what occurs in cattle (ANDRADE et al., 2012). Additionally, health education measures could be taken to control the spread of *Neospora* spp. in sheep flocks, through advising farmers to avoid the access of canids to fetal and placental tissue of potentially infected sheep and other host species.

Despite the low infection rates by *Neospora* spp. found in each flock, this protozoan was detected in 90% of the farms studied, showing its presence within the Central-Western, Northwestern, Southwestern and Southeastern regions of the Rio Grande do Sul state, possibly causing reproductive losses for sheep farming operations. In the present study, reproductive problems were noticed in 30% (3/10) of the farms, similarly to 38.7% (12/31) described at Federal District, Brazil (UENO et al., 2009). However, as reported by Moura et al. (2014), this factor was not significantly associated with the frequency of antibodies against *Neospora* spp. in the flocks.

Sheep play a significant role regarding human toxoplasmosis, as a direct source of *T. gondii* transmission through undercooked meat consumption. In addition, toxoplasmosis causes great economic losses in sheep production. Neosporosis causes neonatal mortality and abortion in ruminants. The wide occurrence of *Neospora* spp. in the flocks showed that its economic impact on the sheep industry could be underestimated. Therefore, toxoplasmosis and neosporosis are diseases that should be considered in the health management of sheep flocks in Rio Grande do Sul state, Brazil.

Conclusion

This study showed that *Neospora* spp. and *T. gondii* are spread through sheep flocks from Central-Western, Northwestern, Southwestern and Southeastern of the Rio Grande do Sul state, Brazil. The occurrence of these parasites may be related to multifactorial causes identified in the farms. However, no association was found between the frequencies of *Neospora* spp. and *T. gondii* seropositive sheep and each potential risk factor evaluated, except in regards to the presence of cats, which was associated with higher frequencies of antibodies against *T. gondii* within the flocks.

Comitê de Ética em Experimentação Animal

All procedures with animals and experimentation were performed under supervision of veterinarians and in accordance with the recommendations imposed by the *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CEUA) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (process number 069/2014).

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, G. S.; BRHUNA, F.R.P.; ROCHA, M.B.M.; GUIMARÃES, A.S.; GOUVEIA, A.M.G.; GUIMARÃES, A.M. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in sheep in the state Minas Gerais, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.188, p.168–171, 2012.
- ANDREOTTI, R.; MATOS, M. F. C.; GONÇALVES, K.N.; OSHIRO, L.M.; LIMA-JUNIOR, M.S.C.; PAIVA, F.; LEITE, F.L. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v.18, p. 19-22, 2009.
- BARTOVÁ, E.; SEDLÁK, K.; LITERÁK, I. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in sheep in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, v. 161, n. 1, p. 131-132, 2009.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. *Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991.
- CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.12, p.117–118, 1964.
- CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. DUBEY, J.P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.5, p.572-578, 1993.
- DALLA ROSA, L.; DE MOURA, A.B.; GÜTHS, M.F.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; DE SOUZA, A.P. Prevalência e fatores de risco para infecção por *Neospora caninum* em ovinos no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.10, n.2, p.127-137, 2011.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v. 2, p.230–233, 1990a.
- DUBEY, J.P, SONN, R.J., HEDSTROM, O., SNYDER, S.P., LASSEN, E.D. Serologic and histologic diagnosis of toxoplasmic abortions in sheep in Oregon. *Journal of The American Veterinary Medical Association*. v.196, p.291–294, 1990b.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*. v.67, p.1–59, 1996.

- DUBEY, J.P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*. v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. *Veterinary Parasitology*. v.163, p.1–14. 2009.
- FIGLUOLO, L.P.C.; KASAI, N.; RAGOZO, A.M.A.; DE PAULA, V.SO.; DIAS, R.A.; SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.123, p.161–166, 2004.
- FILHO, E.B.; RAMOS, O.S.; FREITAS, J.A. Inquérito sorológico de *Toxoplasma gondii* em ovinos na microrregião Castanhal, Pará, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.4, p.707-710, 2010.
- GARCIA, J.L., NAVARRO, I.T. OGAWA, L., de OLIVEIRA, L., de OLIVEIRA, R.C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e case de propriedades rurais do município de Jaguapita, Estado do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*. v.29, p.99-104, 1999.
- JOLLEY, W.R., McALLISTER, M.M., McGUIRE, A.M., WILLS, R.A. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Veterinary Parasitology*. v.82, p.251–257, 1999.
- KOBAYASHI, Y., YAMADA, M., OMATA, Y., KOYAMA, T., SAITO, A., MATSUDA, T., OKUYAMA, K., FUJIMOTO, S., FURUOKA, H., MATSUI, T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *The Journal of Parasitology*. v.87, p.434–436, 2001.
- LANGONI, H., JÚNIOR, H.G., GUIMARÃES, F.F., ULLMAN, L.S., GAIO, F.C., UEHARA, R.S., ROSA, E.P., AMORIM, R.M., DA SILVA, R. Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.177, p.50–54, 2011.
- LINDSAY, D.S., RIPPEY, N.S., POWE, T.A., SARTIN, E.A., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*. v.56, p.1176–1180, 1995.
- LOPES, W.D.Z. *Aspectos da infecção toxoplásmica no sistema reprodutor de ovinos (Ovis aries) machos experimentalmente infectados*. 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - FCAVJ – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

MUNHÓZ, K.F.; DE LUCA NETO, M.; SANTOS, S.M.A.; GARCIA, J.L.; GUIMARÃES JUNIOR, J.S.; VIDOTTO, O.; HEADLEY, S.A.; YAMAMURA, M.H. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from farms located in northern Parana, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 4, p. 1031-1040. 2010.

OPEL, U., CHARLESTON, W.A.G., POMROY, W.E. ROMMEL, M. A survey of the prevalence of *Toxoplasma* infection in goats in New Zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescence tests. *Veterinary Parasitology*, v.40, p.181-186. 1991.

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

PINHEIRO JR, J.W.; MOTA, R.A.; OLIVEIRA, A.A.F.; FARIA, E.B.; GONDIM, L.F.P.; DA SILVA, A.V.; ANDERLINI, G.A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitology Research*, v.105, p.709-715, 2009.

ROMANELLI, P. R. ; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Research in Veterinary Science*, v.82, p.202-207, 2007.

ROSSI, G.F., CABRAL, D.D., RIBEIRO, D.P., PAJUABA, A.C.A.M., CORRÊA, R.R., MOREIRA, R.Q., MINEO, T.W.P., MINEO, J.R., SILVA, D.A.O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. *Veterinary Parasitology*, v.175, p.252–259, 2011.

SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, R.L.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R.A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, v.33, n.1, 2003.

SOARES, H. S.; AHID, S.M.M.; BEZERRA, A.C.D.S.; PENA, H.F.J.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.160, p.211-214, 2009.

TESOLINI, P.M.A.; DE LEÃO, G.C.; BELTRAME, M.A.V; GUMIEIRO, M.V.; BARIONI, G. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da raça Santa Inês na região da Grande Vitória, estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Ciência Veterinárias*, v. 19, n. 1, p. 38-41, 2012.

UENO, T. E. H. *Prevalência das infecções por Toxoplasma gondii e Neospora caninum em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil*. 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada Zoonoses, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

UENO, T. E. H.; GONÇALVES, V.S.P.; HEINEMANN, M.B.; DILLI, T.L.B.; AKIMOTO, B.M.; DE SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v.41, p.547-552, 2009.

WEISS. *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. New York: Elsevier Ltd., 2007.

Figure 1. Ten studied sheep flocks located in eight counties from Rio Grande do Sul state, southern Brazil. Black spheres depict the location of the farms.

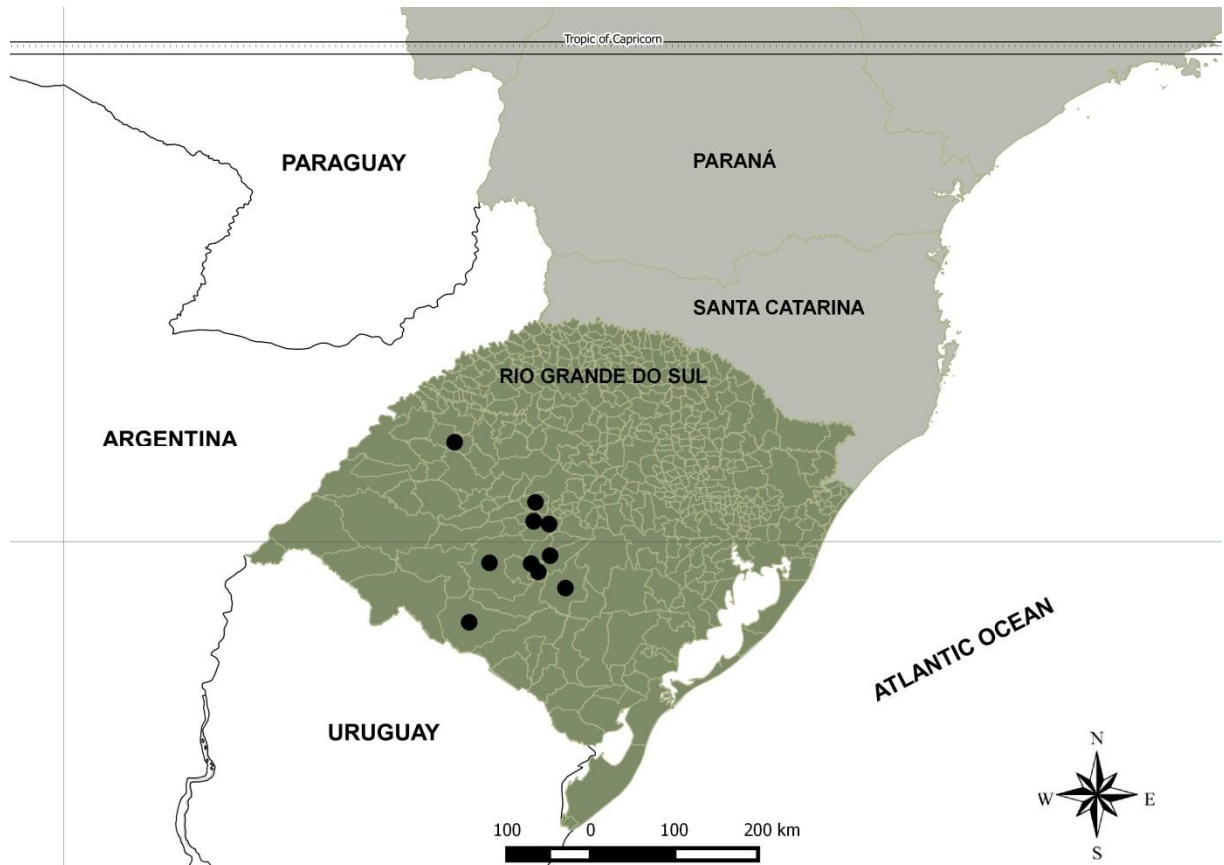


Figure 2. Distribution and strata (upper, intermediate, lower) of the frequency of *Neospora* spp. seropositive sheep in each farm (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). Different lowercase letters on each column (a, b, c, d, e) indicate significant differences, assessed by the Chi-square test at 95% confidence interval.

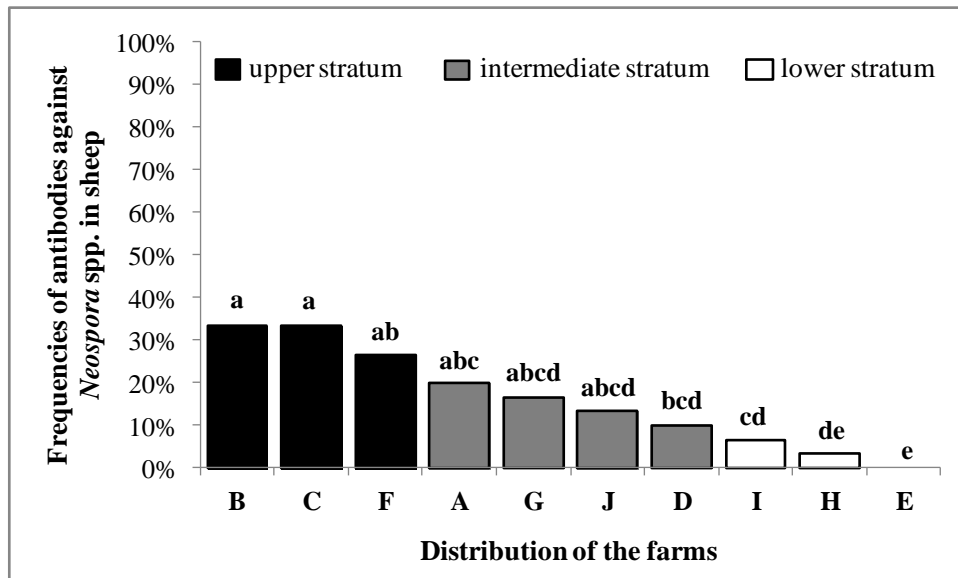


Figure 3. Distribution and strata (upper, intermediate, lower) of the frequency of *Toxoplasma gondii* seropositive sheep in each farm (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). Different lowercase letters on each column (a, b, c, d, e) indicate significant differences, assessed by the Chi-square test at 95% confidence interval.

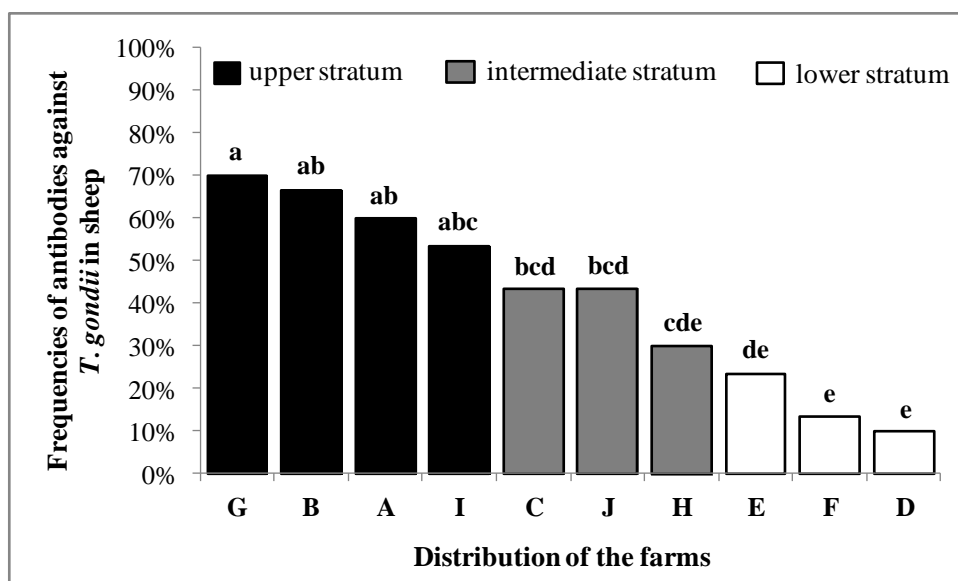


Table 1. Frequencies of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* seropositive sheep and risk factors observed in each studied farm.

Farms	Seropositive sheep (%) ^a		Presence/absence of potential risk factors as informed by the farms' owners						
	<i>Neosp.</i>	<i>Toxopl.</i>	Dogs	Cats ^b	Wild canids/felids	Wild rodents	Weir water	Stream water	Reproductive problems
A	20.0	60.0	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
B	33.3	66.6	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	No
C	33.3	43.3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
D	10.0	10.0	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	No
E	0	23.3	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No
F	26.6	13.3	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
G	16.6	70.0	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
H	3.3	30.0	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No
I	6.6	53.3	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
J	13.3	43.3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Total (%)	16.3	41.3	100	50.0	90.0	90.0	80.0	30.0	30.0

^a Percentages of *Neospora* spp. (*Neosp.*) and *T. gondii* (*Toxopl.*) seropositive sheep in each of the ten farms (30 sheep samples per farm).

^b Presence of cats in the farm was significantly associated ($p = 0.047$) with high frequencies of *T. gondii* seropositive sheep in the flock, as assessed by the Fisher's exact test at 95% confidence interval.