

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -**  
**PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**PESQUISA DE *SARCOCYSTIS* spp. E *NEOSPORA CANINUM*  
EM TECIDOS REPRODUTIVOS DE GATOS DOMÉSTICOS  
ASSELVAJADOS NA ILHA FURTADA, MANGARATIBA, ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO**

**Erica Rodrigues de Matos**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**PESQUISA DE *SARCOCYSTIS* spp. E *NEOSPORA CANINUM* EM TECIDOS  
REPRODUTIVOS DE GATOS DOMÉSTICOS ASSELVAJADOS NA ILHA  
FURTADA, MANGARATIBA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**ERICA RODRIGUES DE MATOS**

*Sob a Orientação da Professora  
Andressa Ferreira da Silva*

*e Coorientação da Professora  
Vera Lucia Teixeira de Jesus*

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**, no  
Curso de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária (Patologia e Ciências  
Clínicas), Área de Concentração em  
Patologia Animal.

Seropédica, RJ  
Julho de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R425p Rodrigues de Matos, Erica, 1989-  
Pesquisa de *Sarcocystis* spp. e *Neospora caninum*  
em Tecidos Reprodutivos de Gatos Domésticos  
Asselvajados na Ilha Furtada, Mangaratiba, Estado do  
Rio de Janeiro / Erica Rodrigues de Matos. -  
Seropédica, 2023.  
57 f.: il.

Orientadora: Andressa Ferreira da Silva.  
Coorientadora: Vera Lucia Teixeira de Jesus.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, 2023.

1. *Sarcocystis* spp.. 2. *Neospora caninum*. 3.  
Tecidos reprodutivos. 4. Diagnóstico histopatológico.  
5. Diagnóstico molecular. I. Ferreira da Silva,  
Andressa, 1982-, orient. II. Teixeira de Jesus, Vera  
Lucia, 1959-, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -  
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**ERICA RODRIGUES DE MATOS**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/07/2023**

---

Andressa Ferreira da Silva Spyrides. Dra. UFRRJ  
(Orientadora)

---

Daniel Guimarães Ubiali. Dr. UFRRJ

---

Bruno Ricardo Soares Alberigi da Silva. Dr. UFRRJ

---

Gideão da Silva Galvão. Dr. UFRB



Emitido em 2023

**TERMO N° 953/2023 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 21/08/2023 14:40 )*  
ANDRESSA FERREIRA DA SILVA SPYRIDES  
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*  
*DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)*  
*Matrícula: ####327#6*

*(Assinado digitalmente em 22/08/2023 12:51 )*  
BRUNO RICARDO SOARES ALBERIGI DA SILVA  
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*  
*DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)*  
*Matrícula: ####518#7*

*(Assinado digitalmente em 21/08/2023 15:26 )*  
DANIEL GUIMARAES UBIALI  
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*  
*DESP (12.28.01.00.00.00.52)*  
*Matrícula: ####017#8*

*(Assinado digitalmente em 01/09/2023 14:10 )*  
GIDEÃO DA SILVA GALVÃO  
*ASSINANTE EXTERNO*  
*CPF: ####.###.745-##*

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **953**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **21/08/2023** e o código de verificação: **3cba00d29d**

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos  
meus pais Antonio Correa de Matos e  
Eliza Rodrigues de Matos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela força, coragem e serenidade e por colocar todas essas pessoas e profissionais especiais em meu caminho que tanto contribuíram para a realização dessa pesquisa e desse sonho.

Minha eterna gratidão à minha orientadora, professora Dra. Andressa Ferreira da Silva e a minha coorientadora, professora Dra. Vera Lucia Teixeira de Jesus. Agradeço às duas pela oportunidade, por todo apoio e incentivo e por contribuírem de todas as formas para que esse projeto pudesse ser concluído.

Ao professor Dr. Daniel Guimarães Ubiali e a toda equipe do Setor de Anatomia Patológica - SAP em especial ao Davi de Souza Leal, a Marina Souza Cunha e ao Sr. Walter Leira (Sr. Valtinho) e aos demais pós-graduandos pela receptividade.

A professora Dra. Bruna de Azevedo Baêta, o Matheus Dias Cordeiro e a toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias pela enorme contribuição no desenvolvimento desse projeto. A todos os alunos de Iniciação Científica: Renata Silva, Ellen Meireles, Eduardo Sena e Wendel Benac e aos demais pós-graduandos que sempre foram muito gentis e prestativos.

A Olivia Zen Gianfrancisco que sempre foi muito gentil e profissional, me auxiliou em diversos momentos, compartilhou seus conhecimentos de forma muito generosa.

Ao professor Dr. Luis Fernando Pita Gondim da Universidade Federal da Bahia (UFBA) que nos cedeu gentilmente os controles positivos para o diagnóstico molecular.

Ao Me. Fagner D'ambroso Fernandes da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) que também nos cedeu controles positivos para o diagnóstico molecular.

Ao professor Dr. Douglas McIntosh que compartilhou sua experiência e fez sugestões de maneira muito solícita.

Ao meu fiel amigo inseparável, filho de quatro patas Duck pela companhia de todos os momentos e por me inspirar a ser uma profissional melhor todos os dias.

Aos meus pais Antonio Correa de Matos e Eliza Rodrigues de Matos por serem pais maravilhosos, por terem me apoiado muito nessa etapa do mestrado e por me incentivarem a buscar os meus sonhos.

A minha irmã Eliziane Rodrigues de Matos Bitencourt e meu cunhado Sandro Bitencourt a minha enorme gratidão por me incentivar e apoiar de todas as maneiras para que esta etapa fosse concluída.

Ao meu namorado e amigo, Gustavo Cardoso Moreira pela parceria, sobretudo pelo carinho, apoio e incentivo durante a fase final.

A minha querida amiga Carolina Soares van der Meer que desde a graduação sempre incentiva e apoia as minhas decisões.

Ao amigo Renato Manassés Farias Valentim pelas palavras de apoio e incentivo.

Aos colegas pós-graduandos Alex Heringer, Leila Alves, Camila Rodrigues, Renata Lima e Natalie Zorzi pela parceria durante esses anos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pela concessão da Bolsa de Mestrado Nota 10, no último ano do mestrado, permitiu maior dedicação e tranquilidade para o desenvolvimento da pesquisa.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - PPGMV e a todos os professores envolvidos nas disciplinas.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por fazer com que eu me sinta em casa mesmo nos momentos mais difíceis e por me proporcionar mais uma conquista profissional e pessoal.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que essa pesquisa fosse realizada.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

MATOS, Erica Rodrigues de. **Pesquisa de *Sarcocystis* spp. e *Neospora caninum* em tecidos reprodutivos de gatos domésticos asselvajados na Ilha Furtada, Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.** 2023. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

*Sarcocystis* spp. e *Neospora caninum* são protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à família Sarcocystidae. Possuem um ciclo heteroxeno, necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo. A fase sexuada ocorre no hospedeiro definitivo e a fase assexuada no hospedeiro intermediário, infectando uma grande variedade de espécies animais. Ambos os agentes são formadores de cistos teciduais na musculatura do hospedeiro intermediário. A epidemiologia desses coccídios em gatos é pouco conhecida e há escassez de estudos na literatura brasileira. Desse modo, o principal objetivo foi pesquisar protozoários *Sarcocystis* spp. e *N. caninum* em tecidos reprodutivos de gatos asselvajados por meio do diagnóstico histopatológico e molecular. Amostras foram cedidas pelo Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, onde foi feito o processamento e diagnóstico histopatológico. Por se tratar de amostras cedidas, a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 6422250523/2023 (ID 002533) tornou a submissão invalidada, não tendo necessidade de aprovação, pois a proposta está fora do escopo da legislação pertinente. Todos os tecidos reprodutivos foram oriundos de gatos castrados da Ilha Furtada, conhecida popularmente como Ilha dos Gatos, localizada no município de Mangaratiba, Costa Verde do Rio de Janeiro. O levantamento de dados foi realizado por meio do arquivo do SAP para obter informações como sexo, raça e estágio de vida. Para o diagnóstico histopatológico 54 amostras de órgãos reprodutivos conservados em formol a 10%, dentre eles ovários, tubas uterinas, placenta e testículos foram clivados, em dimensões longitudinais de 3 mm por 25 mm, e os cornos uterinos foram submetidos a cortes transversais de 3 mm. Os fragmentos foram inseridos em cassetes histológicos e conservados em álcool anidro. As lâminas foram processadas e confeccionadas com os corantes Hematoxilina e Eosina (HE), em seguida foram analisadas por microscopia óptica, nas objetivas de 4x, 10x e 40x. Nas lâminas analisadas nenhum cisto foi visualizado, com isso os tecidos foram considerados histologicamente negativos, além disso não foram encontradas alterações microscópicas. Para o diagnóstico molecular foram cedidas 63 amostras de tecidos reprodutivos congelados que foram submetidas a análise no Laboratório de Doenças Parasitárias / Cultivo de células e hemoparasitos da UFRRJ. Foi feita triagem para o gene que reconhece a enzima GAPDH (Proteína Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) a fim de verificar a efetividade da extração de DNA. Foram usados iniciadores específicos para os genes COI direto e reverso de *Sarcocystis* spp. e Nc5 de *N. caninum*. O DNA de ambos os protozoários não foi detectado em nenhuma amostra analisada por diagnóstico molecular. Esse foi o primeiro estudo a utilizar tecidos reprodutivos para diagnóstico de *Sarcocystis* spp. e *N. caninum* e o primeiro a ser realizado com os gatos asselvajados da Ilha Furtada. Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que a população de gatos incluídas neste estudo não apresenta os protozoários em seus órgãos reprodutivos e é possível evidenciar que ambos os agentes não demonstram predileção por esses órgãos e não costumam parasitar esses tecidos.

Palavras-chave: Felinos, Histopatologia, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## ABSTRACT

MATOS, Erica Rodrigues de. **Search for *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in reproductive tissues of wild domestic cats on Ilha Furtada, Mangaratiba, State of Rio de Janeiro.** 2023. 57p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Veterinary Institute, Department of Veterinary Medicine and Surgery, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

*Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* are obligate intracellular protozoans belonging to the Sarcocystidae family. They have a heteroxene cycle, need two hosts to complete the cycle. The sexual phase occurs in the definitive host and the asexual phase in the intermediate host, infecting a wide variety of animal species. Both agents form tissue cysts in the muscles of the intermediate host. The epidemiology of these coccidia in cats is little known and there are few studies in the Brazilian literature. Thus, the main objective was to research protozoa *Sarcocystis* spp. and *N. caninum* in reproductive tissues of feral cats through histopathological and molecular diagnosis. Samples were provided by the Pathological Anatomy Sector (SAP) of UFRRJ, where the histopathological processing and diagnosis were performed. As these are samples provided, the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA) under protocol number 6422250523/2023 (ID 002533) made the submission invalid, with no need for approval, as the proposal is outside the scope of legislation relevant. All reproductive tissues came from castrated cats from Ilha Furtada, popularly known as Ilha dos Gatos, located in the municipality of Mangaratiba, Costa Verde do Rio de Janeiro. Data collection was carried out using the SAP file to obtain information such as gender, race and life expectancy. For the histopathological diagnosis, 54 samples of reproductive organs preserved in 10% formaldehyde, among them several, uterine tubes, placentas and testicles were cleaved, in longitudinal dimensions of 3 mm by 25 mm, and the uterine horns were submitted to 3 mm transverse cuts. The fragments were inserted into histological cassettes and preserved in anhydrous alcohol. The slides were processed and made with Hematoxylin and Eosin (HE) dyes, then analyzed by optical microscopy, using 4x, 10x and 40x objectives. In the slides analyzed, no cysts were visualized, with that the tissues were considered histologically negative, in addition, no microscopic alterations were found. For molecular diagnosis, 63 samples of frozen reproductive tissues were provided and submitted for analysis at the Laboratory of Parasitic Diseases / Culture of cells and hemoparasites at UFRRJ. Screening for the gene that recognizes the enzyme GAPDH (Protein Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) was performed in order to verify the effectiveness of DNA extraction. Specific primers for the forward and reverse COI genes of *Sarcocystis* spp. and *Nc5* from *N. caninum*. The DNA of both protozoans was not detected in any sample analyzed by molecular diagnostics. This was the first study to use reproductive tissues for the diagnosis of *Sarcocystis* spp. and *N. caninum* and the first to be carried out with feral cats from Ilha Furtada. Based on the results obtained in this research, it can be concluded that the population of cats included in this study does not present the protozoa in their reproductive organs and it is possible to show that both agents do not show a predilection for these organs and do not usually parasitize these tissues.

**Key words:** Cats, Histopathology, Polymerase Chain Reaction (PCR).

## **LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS**

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DESP	Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública;
DNA	Ácido Desoxirribonucléico;
EI	Espécies invasoras;
FELV	Vírus da Leucemia Felina;
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina;
GAPDH	Proteína Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase;
HD	Hospedeiro definitivo;
HE	Hematoxilina e Eosina;
HI	Hospedeiro intermediário;
IC	Intervalo de confiança;
IFI	Imunofluorescência indireta;
IgG	Imunoglobulina G;
IgM	Imunoglobulina M;
IV	Instituto de Veterinária;
LADOPAR	Laboratório de Doenças Parasitárias;
MEP	Mieloencefalite Equina por Protozoário;
mm	Milímetros;
ONG	Organização não governamental;
PBS	Phosphate-buffered saline;
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase;
PFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição;
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta;
SAP	Setor de Anatomia Patológica;
SRD	Sem raça definida;
Taq	Taq DNA polimerase;
TBE	Tris-Borato-EDTA;
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria;

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema do ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. Fonte: Adaptado de Lindsay and Dubey 2020; Swar and Shnawa 2021.

**Figura 2.** Esquema do ciclo biológico de *Neospora caninum*. Fonte: Adaptado de Dubey (2003) e Alves (2022).

**Figura 3.** Processamento das amostras realizado no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Desidratação em álcool (A). Clarificação pelo xitol (B). Emblocamento pela parafina (C) e Microtomia (D).

**Figura 4.** Livro de diagnósticos do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, referente ao registros (37504 a 38493) do mês de agosto de 2021 a maio de 2022. Arquivo de onde foram retirados os dados dos animais inseridos na pesquisa.

**Figura 5.** Imagem das lâminas de tecidos reprodutivos de fêmea (38099 A) e macho (38104 A) de gatos, confeccionados com o corante Hematoxilina & Eosina e identificadas conforme registro do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ.

**Figura 6.** Representação gráfica da porcentagem dos gatos por sexo.

**Figura 7.** Representação gráfica do número de gatos por faixa etária.

**Figura 8.** Imagem do gel de agarose 1,5% demonstrando os controles positivos para *Sarcocystis* spp. Amostras provenientes de cistos de tecido esofágico de ovinos oriundos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Seguida de marcador de tamanho molecular de 100pb.

**Figura 9.** Imagem do gel de agarose 1,5% demonstrando o primeiro controle positivo para *N. caninum* de amostra proveniente de cepa NC-Bahia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), segundo e terceiro controle de amostra de cultivo celular do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Seguida de marcador de tamanho molecular de 100pb.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
2.1 <i>Sarcocystis</i> spp.	2
2.1.1 Ciclo biológico, transmissão e patogenia	2
2.1.2 <i>Sarcocystis</i> spp. em felinos	4
2.1.3 <i>Sarcocystis</i> em outras espécies	8
2.1.4 Aspectos zoonóticos	9
2.1.5 Diagnóstico sorológico	10
2.1.6 Diagnóstico histopatológico	10
2.1.7 Diagnóstico molecular	11
2.1.8 Controle e prevenção	11
2.2 <i>Neospora caninum</i>	12
2.2.1 Ciclo biológico, transmissão e patogenia	12
2.2.2 <i>Neospora caninum</i> em felinos	14
2.2.3 <i>Neospora caninum</i> em outras espécies	16
2.2.4 Diagnóstico sorológico	18
2.2.5 Diagnóstico histopatológico	18
2.2.6 Diagnóstico molecular	19
2.2.7 Controle e prevenção	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
3.1 Aspectos éticos	21
3.2 Origem das amostras	21
3.3 Localização do estudo	21
3.4 Diagnóstico histopatológico	21
3.5 Diagnóstico molecular	23
3.5.1 Extração de DNA dos tecidos	23
3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
3.5.3 Protocolo para detecção do gênero <i>Sarcocystis</i> spp.	24
3.5.4 Protocolo para detecção da espécie <i>Neospora caninum</i>	24
3.5.5 Eletroforese e análise dos resultados	24
<b>4 RESULTADOS</b>	25
4.1 Levantamento de dados	25
4.2 Diagnóstico histológico e molecular	26
<b>5 DISCUSSÃO</b>	28
<b>6 CONCLUSÕES</b>	31
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	32
<b>ANEXOS</b>	43
A- Parecer CEUA	43
B- Autorização para uso das amostras	44

## 1 INTRODUÇÃO

Ilha Furtada, localizada em Mangaratiba, no distrito de Itacuruçá, na Costa Verde do Rio de Janeiro, está há 8 km de distância do continente, possui uma vegetação selvagem e densa e sem faixa de areia. Não é habitada por humanos e tornou-se um local de descarte de gatos indesejados, por esse motivo o local tornou-se conhecido como “Ilha dos Gatos”. Não é possível estimar o número preciso de felinos que habitam a ilha, pois não há dados científicos e até o momento nenhum estudo havia sido realizado com esses animais.

Os gatos por não terem convívio com humanos tornaram-se selvagens e reproduziram-se descontroladamente. A falta de alimentos e de água potável levou esses animais a hábitos de canibalismo e caça, o que provoca um desajuste na cadeia alimentar, por competição direta com outros animais, considerando que os gatos dividem espaço com várias espécies nativas silvestres, tais como: gambás, aves migratórias, cotias, capivaras, lagartos, pacas, entre outros.

*Sarcocystis* spp. e *Neospora caninum* são protozoários coccídios pertencentes à família Sarcocystidae. Possuem um ciclo de vida heteroxeno, necessitam de um hospedeiro definitivo, onde ocorre a reprodução sexuada e um hospedeiro intermediário, onde ocorre a reprodução assexuada e podem formar cistos teciduais na musculatura. Os gatos atuam como hospedeiros definitivos de várias espécies de *Sarcocystis* spp. e há relatos que podem atuar também como hospedeiro intermediário, em contrapartida são hospedeiros intermediários de *N. caninum*. Observa-se que na literatura, há uma carência de trabalhos no Brasil sobre a ocorrência desses dois agentes em gatos, além da escassez de estudos sobre gatos ferais e possíveis impactos provocados aos demais animais, assim como as doenças transmitidas.

O gênero *Sarcocystis* spp. comprehende uma grande variedade de espécies e é reconhecido como agente etiológico da sarcocistose, zoonose transmitida ao homem através da ingestão de carne contaminada com cistos. A espécie *N. caninum* é uma das principais causas de aborto em gados, em pequenos ruminantes também está envolvido com abortos e falhas reprodutivas e em cães alterações neurológicas. Não é considerado um patógeno zoonótico, mas existem trabalhos que por meio de exames sorológicos relataram a exposição humana. Embora, alguns trabalhos relatam a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em gatos, sabe-se muito pouco sobre a epidemiologia da infecção e até o momento não se sabe de nenhum estudo realizado utilizando o diagnóstico molecular.

A presença de gatos em áreas silvestres ameaça severamente espécies endêmicas e nativas, além disso, podem veicular patógenos através do solo e no caso da ilha que possui um terreno acidentado pode carrear parasitos para o mar e dessa forma contaminar espécies marinhas e peixes tendo em vista que o município é banhado pela Baía de Sepetiba e faz divisa com outras cidades como Itaguaí, Angra dos Reis e Rio Claro. Desse modo, o objetivo foi pesquisar por meio de diferentes métodos diagnósticos, *Sarcocystis* spp. e *Neospora caninum* a partir de amostras de tecidos de órgãos reprodutivos, tendo sido utilizado a histopatologia para caracterizar a presença ou ausência de cistos e possíveis lesões nos gatos afetados e a detecção molecular por meio da PCR convencional.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Sarcocystis* spp.

Em 1843, filamentos de coloração branca leitosa nos músculos de um rato (*Mus musculus*), foram observados por Friedrich Miescher na Suíça (Miescher 1843). Estes filamentos foram conhecidos como túbulos de Miescher durante muitos anos. Mais tarde, o organismo causador do problema foi batizado como *Sarcocystis* após Lankester (1882), uma palavra grega derivada de "sarkos", que significa músculo ou carne, e "kystis", que significa bexiga, descrever a forma do parasita encistou no tecido dos hospedeiros intermediários (FAYER, 2004).

O gênero *Sarcocystis* consiste em parasitos protozoários coccídios intracelulares com a capacidade de invadir o tecido muscular e maturar em sarcocistos, causando a doença zoonótica sarcocistose (MOHD FADIL et al., 2019). Atualmente, são conhecidas mais de 220 espécies de *Sarcocystis*. Algumas das espécies são organismos patogênicos para humanos, animais domésticos e selvagens (PRAKAS e BUTKAUSKAS, 2012). Dentre as espécies de *Sarcocystis*, existem algumas diferenças em relação ao ciclo e patogenicidade, porém a formação de cistos teciduais é uma característica comum dentro do gênero (MINUZZI, 2018). Causam infecção em humanos e animais em todo o mundo. Algumas dessas espécies causam doenças clínicas e subclínicas no hospedeiro, podendo levar a perdas econômicas (PESTECHIAN et al., 2021).

A terminologia para *Sarcocystis* spp. foi sugerido por combinar os nomes latinos de intermediários e hospedeiros definidos. (FAYER, 2004). As seguintes espécies são encontradas em animais domésticos: Três espécies no boi: *S. cruzi* (cão, lobo, coiote, guaxinim, raposa), *S. hirsuta* (gato), *S. hominis* (homem, macaco); duas espécies nos ovinos: *S. ovicanis* (cão), *S. tenella* (gato); três espécies no porco: *S. miescheriana* (cão), *S. porcifelis* sp (gato), *S. porcathomis* sp (homem); e uma espécie no cavalo: *S. bertrami* (cão). *Sarcocystis cruzi*, *S. ovicanis* e *S. porcifelis* são altamente patogênicos para bois, ovinos e suínos, respectivamente DUBEY (1976). *S. gigantea* e *S. medusiformis*, que são transmitidos por gatos e outros felinos (GJERDE et al., 2020). Pelo menos quatro *Sarcocystis* spp. (*S. falcatula*, *S. neurona*, *S. lindsayi* e *S. speeri*) utilizam gambás (*Didelphis* spp.) como hospedeiros definitivos, e dois deles, *S. neurona* e *S. falcatula*, são conhecidos por causar doenças em cavalos e aves, respectivamente (GONDIM et al., 2021).

#### 2.1.1 Ciclo biológico, transmissão e patogenia

As espécies de *Sarcocystis* spp. geralmente têm um ciclo estrito de dois hospedeiros, com herbívoros como hospedeiros intermediários e carnívoros como hospedeiros definitivos (DUBEY, 2015). Este protozoário é um coccídio, intracelular obrigatório, de ciclo heteroxeno, capaz de infectar uma gama grande de hospedeiros (MINUZZI, 2018). Compreende o desenvolvimento sexuado e formação de oocistos na mucosa intestinal de seus hospedeiros definitivos (carnívoros e onívoros) e multiplicação assexuada em células endoteliais vasculares e musculares estriadas, respectivamente, de seus hospedeiros intermediários (herbívoros, onívoros e carnívoros) (GJERDE et al., 2020).

A infecção começa quando oocistos ou esporocistos nas fezes de um hospedeiro final são ingeridos por um hospedeiro intermediário ou hospedeiro suscetível (Figura 1) (FAYER et al., 2015) que adquire a infecção pela ingestão de alimentos e água contaminados. Depois que os esporocistos são ingeridos, os esporozoítos são liberados dos esporocistos e iniciam um ciclo

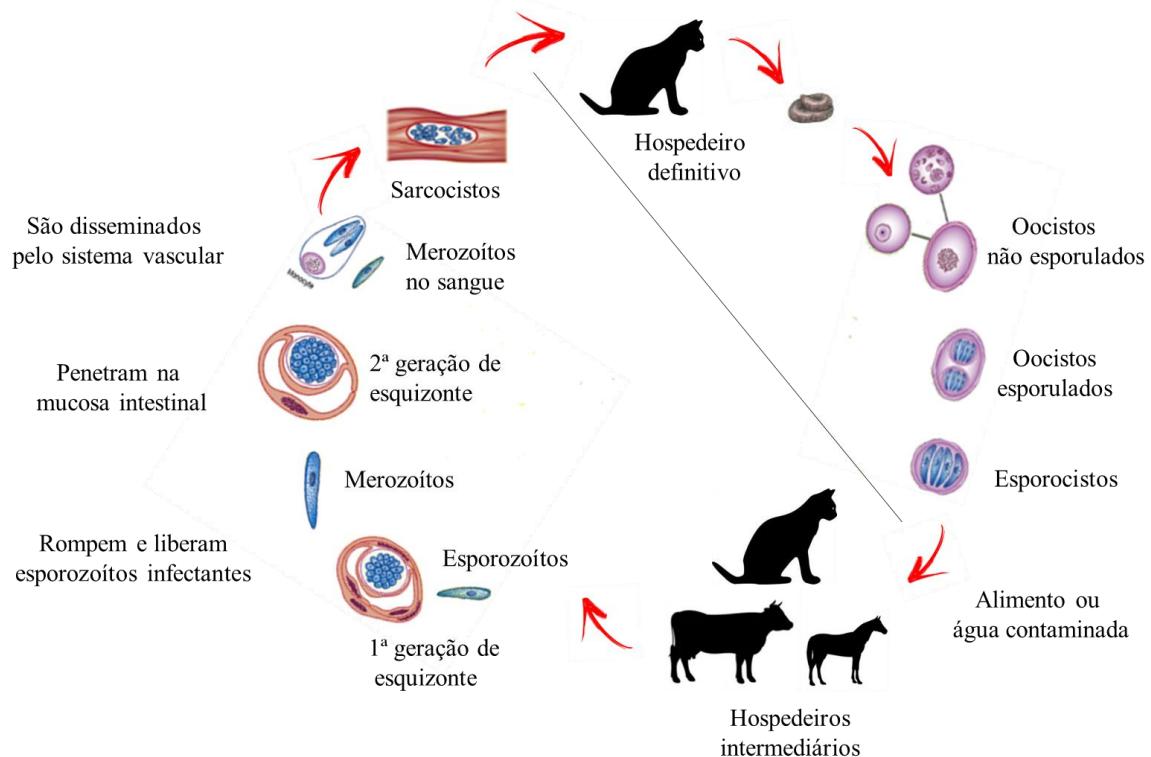
assexuado complexo. O esporozoíto migra do testículo para tecidos extraintestinais. O núcleo do esporozoíto se divide em muitos lóbulos, eventualmente formando merozoítos. O o estágio de divisão é chamado de esquizonte. Os esquizontes são formados em uma variedade de células, incluindo células endoteliais vasculares, células somáticas, e células neuronais, dependendo da espécie de *Sarcocystis*. Após alguns ciclos de esquizontes, o parasita encista, geralmente em um miócito, formando primeiro metrócitos que dão origem aos bradizoítos. (DUBEY, 2015).

O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de tecidos de herbívoros com estágio encistado (sarcocisto) do parasita contendo centenas de bradizoítos. A gametogonia geralmente ocorre na lâmina própria do intestino delgado, levando à formação de oocistos não esporulados. Os bradizoítos transformam-se em gametas masculinos e femininos no intestino delgado em um dia após a ingestão da carne infectada; não há multiplicação do parasita no hospedeiro definitivo (DUBEY, 2015).

No trato intestinal do hospedeiro intermediário, os esporocistos se rompem e liberam esporozoítos infectantes. Estes penetram na mucosa intestinal, são disseminados pelo sistema vascular e desenvolvem-se intracelularmente nas células endoteliais dos capilares e em outros pequenos vasos (REYS, 2008; STELMANN & AMORIM, 2010), ultrapassam a barreira hematoencefálica e atacam o sistema nervoso central (MOURA et al., 2008).

Os oocistos esporulam geralmente dentro de uma semana após a ingestão de bradizoítos. A parede do oocisto que é frágil e se rompe liberando dois esporocistos, que são o estágio ambientalmente resistente. Cada esporocisto contém quatro esporozoítos. Como os oocistos/esporocistos ficam presos na lâmina própria, sua liberação no lúmen intestinal e nas fezes dura vários meses (DUBEY, 2015).

O estágio encistado é chamado de sarcocisto. Um sarcocisto pode levar um mês ou mais para amadurecer e se tornar infeccioso para o hospedeiro definitivo (DUBEY, 2015). Eles se formam nos músculos e no sistema nervoso central do hospedeiro intermediário, enquanto oocistos e esporocistos desenvolvem-se no intestino delgado do hospedeiro definitivo (JUOZAITYTÈ-NGUGU et al., 2021). A formação de cistos no tecido muscular geralmente não é patogênica e isso explica a característica saudável dos animais abatidos (QUADROS et al., 2019). Eles podem aumentar de tamanho durante anos para se tornarem macroscópicos. Quando maduros podem conter numerosos bradizoítos. Apenas sarcocistos maduros contendo bradizoítos são infecciosos para o hospedeiro definitivo (carnívoro). Os bradizoítos não são infecciosos para o hospedeiro intermediário e os esporocistos não são infecciosos para o hospedeiro definitivo (DUBEY, 2015).



**Figura 1.** Ciclo biológico *Sarcocystis* spp. Fonte: Adaptado de Lindsay and Dubey 2020; Swar and Shnawa 2021).

### 2.1.2 *Sarcocystis* spp. em felinos

Para Canón-Franco et al., (2016) pequenos felinos selvagens no Brasil são hospedeiros intermediários naturais de *S. felis*. Tecidos de 90 pequenos felinos selvagens neotropicais que foram mortos em acidentes rodoviários no estado do Rio Grande do Sul foram avaliados. Amostras foram obtidas dos músculos quadríceps femoral, língua, diafragma, coração, músculos oculares e cérebro. Sarcocistos foram visualizados por microscopia óptica em quatro (dois *Puma yagouaroundi* e 2 *Leopardus guttulus*) de 28 tecidos.

Felinos são classicamente reconhecidos como hospedeiros definitivos para determinadas espécies de *Sarcocystis*, porém, estudos recentes demonstram que esses animais podem desempenhar o papel de hospedeiro intermediário natural para *S. felis* e *S. neurona*. Os animais positivos podem atuar como hospedeiros intermediários e devido a isso é importante investigar o desenvolvimento do sarcocisto tecidual natural (LÚCIO et al., 2019).

De acordo, com Gjerde e Hilali, (2016) os gatos atuam como hospedeiros definitivos de *S. sinensis*. Para Stanek et al., (2003) o gato doméstico (*Felis domesticus*) é uma espécie de hospedeiro intermediário para *S. neurona* e o seu estudo forneceu evidências que sugerem que os gatos selvagens são comumente expostos a esporocistos de *S. neurona* e têm anticorpos circulantes.

Segundo Fernandes et al., (2023) a infecção por *Sarcocystis* em gatos geralmente não está associada a sinais clínicos, mas Dubey et al., (2003) relataram o caso de um gato doméstico macho de quatro meses de idade que desenvolveu sinais neurológicos três dias após a castração. Após 12 dias, o gato foi eutanasiado devido a paralisia. Encefalomielite foi a única lesão observada e foi associada a numerosos esquizontes e merozoítos de *Sarcocystis* no cérebro e na

medula espinhal. O protozoário reagiu positivamente com anticorpo policlonal de coelho específico para *S. neurona*. Dois sarcocistos não identificados estavam presentes no cerebelo.

Um gato parasitado por *S. neurona* apresentou sinais neurológicos, como andar compulsivo, “*head pressing*” e vocalização, foi a óbito, quando encaminhado à necropsia o animal apresentava severa desidratação, emagrecimento, além de leve herniação cerebelar pelo forame magno (HAMMERSCHMITT et al., 2020).

O primeiro caso de doença neurológica associada a *Sarcocystis* a ser diagnosticado foi descrito por Bisby et al., (2010) por meio da visualização de merozoítos no líquido cérebro-espinhal de um gato doméstico de cinco meses de idade diagnosticado com encefalomielite. Na análise do líquido cefalorraquidiano, foi encontrada pleocitose neutrofilica e protozoário intracelular foram observados, merozoítos ovais, com 2-4 mm de largura e 4-6 mm de comprimento, e com arranjos lineares de material nuclear concentrado em um polo. O diagnóstico foi confirmado por um título sérico positivo e análise molecular.

Bisby et al., (2010) relataram o caso de um gato que apresentava deprimido, relutante em andar, exibia postura anormal e apresentava fasciculações musculares generalizadas em repouso, como se estivesse tremendo. Déficits de reação postural estavam presentes em todos os quatro membros enquanto miotático e flexor os reflexos espinhais eram normais. Foi observada hiperestesia à palpação da coluna toracolombar; hiperestesia espinhal cervical não era aparente. Nervos cranianos foram normais, exceto por um reflexo de vômito anormal e inclinação ambígua da cabeça para a direita.

Elsheikha et al., (2006) identificaram *Sarcocystis felis* em gatos necropsiados que apresentava sinais clínicos antes da morte como: convulsões, espasmos de orelha e face, andar em círculos, inclinação da cabeça para o lado esquerdo, estado nutricional bom e hidratação normal, raiva e níveis aumentados de chumbo no sangue foram descartados no sangue. O segundo gato apresentava episódios de febre, antes da morte, mas a causa não foi determinada. Para os autores, não houve manifestações clínicas características para a infecção por *S. felis* e eles enfatizam que os gatos infectados com sarcocistos são assintomáticos.

No Brasil, trabalhos que relatam a ocorrência de *Sarcocystis* spp. em gatos, são em sua maioria achados, demonstrando que não havia a finalidade específica em encontrar esse protozoário. Os resultados obtidos foram predominantemente encontrados por meio de exames sorológicos e parasitológicos que podem ser vistos na Tabela 1.

Ogassawara et al., (1986) realizaram exames coproparasitológicos de 215 gatos, procedentes de diferentes cidades de São Paulo. Foram utilizados os métodos de flutuação em solução saturada de sacarose e centrifugação em água-éter. Um total de 20 (9,3%) gatos foram positivos.

Ragozo et al., (2012) ao pesquisar amostras de fezes de gatos de São Paulo, determinaram a presença de 0,72% de *Sarcocystis* spp. De 138 amostras, apenas um gato foi positivo no exame parasitológico.

Ribeiro et al., (2012) identificaram por meio do exame parasitológico, 2 animais positivos dentre 162 amostras de fezes, no estado de São Paulo.

Gennari et al., (1999) realizaram o exame parasitológico de 187 gatos de São Paulo, dentre eles 16 (8,56%) foram positivos. As fezes foram examinadas pelos métodos de centrífugo-flutuação em solução de sacarose e centrífugo-sedimentação em água-éter.

Gennari et al., (2016) verificaram a frequência de infecções gastrointestinais em 502 gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo. As amostras foram analisadas pelos métodos de flotação e sedimentação e revelaram que de 502 gatos, 7 (1,39%) apresentavam *Sarcocystis* spp. Dos 7 animais positivos, 6 apresentavam diarreia.

Dubey et al., (2002) testaram 502 gatos domésticos, por meio da sorologia, por meio do teste de aglutinação direta e não encontraram anticorpos de *S. neurona* na diluição 1:50, sugerindo que gatos domésticos da cidade de São Paulo não foram expostos a esporocistos de

*S. neurona* de gambás. Serra et al., (2003) identificou por meio do diagnóstico parasitológico de um gato no Rio de Janeiro, dentre 131 amostras. As amostras foram processadas pela técnica de centrifugo-flutuação em solução saturada de açúcar.

Meneses et al., (2014) testaram 272 felinos na Bahia, na qual 134 gatos errantes e 138 de gatos domiciliados pelo teste de imunofluorescência indireta, utilizando-se como antígeno, merozoítos cultivados de *S. neurona*. A positividade foi detectada em 4,0% (11/272) das amostras testadas, com títulos variando de 25 a 800 e não houve nenhuma diferença significativa entre gatos internos e externos.

Koch, (2019) relatou a presença de anticorpos IgG contra *Sarcocystis neurona* e em gatos de Curitiba, no Paraná. Das 100 amostras de soro de gatos, 5% foram positivas para *S. neurona* e concluiu-se que esses animais estão expostos a infecção por ambos os protozoários.

Fernandes et al., (2023) foram os primeiros a detectarem anticorpos anti- *Sarcocystis* spp. em gatos domésticos no Rio Grande do Sul. A Detecção de IgGs anti- nas amostras de soro foi realizada usando o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI). Foram detectados em 24 amostras de soro de gatos com uma frequência de detecção de anticorpos de 4,82% (24/497).

Lúcio et al., (2020) realizaram o diagnóstico histopatológico e molecular e identificaram gatos com cistos teciduais no Rio Grande do Sul. Dentre 100 animais, 5 (5%) foram positivos. Foram identificados sarcocistos nos tecidos musculares, tais como: vasto lateral, intercostal, subescapular e diafragma, mas não foram encontrados cistos na língua, esôfago ou miocárdio. Esses cistos foram achados incidentais de necropsia.

**Tabela 1.** Ocorrência de *Sarcocystis* spp. em gatos, no Brasil.

Estado	Método	Nº amostras	Resultado	Referências
São Paulo	Parasitológico	215	20 (9,3%)	Ogassawara et al., (1986)
São Paulo	Parasitológico	187	16 (8,56%)	Gennari et al., (1999)
São Paulo	Sorologia	502	0	Dubey et al., (2002)
São Paulo	Parasitológico	138	1 (0,72%)	Ragozo et al., (2002)
Rio de Janeiro	Parasitológico	131	1 (08%)	Serra et al., (2003)
Bahia	Sorologia	272	11 (4%)	Meneses et al., (2014)
São Paulo	Parasitológico	162	2 (1%)	Ribeiro et al., (2015)
São Paulo	Parasitológico	502	7 (1,4%)	Gennari et al., (2016)
Paraná	Sorologia	100	5 (5%)	Koch et al., (2019)
Rio Grande do Sul	Histopatologia e PCR	100	5 (5%)	Lúcio et al., (2020)
Rio Grande do Sul	Sorologia	497	24 (4,82%)	Fernandes et al., (2023)

Segundo Ferreira et al., 2020 as técnicas sorológicas podem detectar anticorpos contra *Sarcocystis* spp. em infecções únicas ou mistas. E a técnica por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de *Sarcocystis* em soros bovinos. Onuma et al., (2014) por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) investigaram a presença de anticorpos contra *Sarcocystis neurona* em amostras de soro de onças-pintadas e concluíram a sua exposição a este coccídio.

Gillis, (2003) observou que sarcocistos encontrados nos felinos identificados morfologicamente como *Sarcocystis felis* foram mais abundantes em seções do músculo quadríceps, não havia, reação inflamatória no tecido ao redor e em alguns casos, estes eram visíveis grosseiramente no músculo fresco. Sarcocistos apareceram filamentosos, às vezes enrolados e medindo aproximadamente  $0,1 \times 0,5$  - 20 mm (largura  $\times$  comprimento). Bradizoítos de sarcocistos frescos mediam  $3,3 \times 8,8$   $\mu\text{m}$  (largura  $\times$  comprimento).

Castel et al., (2019) relataram o caso de um gato castrado de 6 anos de idade, que por meio de biópsias dos músculos tibial e tríceps cranial direito, avaliadas em cortes congelados e fixados em parafina, havia miosite multifocal leve a moderada com várias miofibrilas contendo grandes cistos parasitários medindo 150-200  $\mu\text{M}$  de diâmetro compatíveis com *Sarcocystis* sp. As infiltrações de células mononucleares ocorreram em locais distantes dos cistos do parasita e não foram diretamente invasivas.

Entre gatos necropsiados três, apresentaram grande número de cistos de *Sarcocystis felis* em suas miofibrilas. Os cistos estavam em seções do esqueleto, músculos do pescoço, intercostais e diafragma, e em músculos do coração, esses se expandiram e apagaram o sarcoplasma, e delineados por uma cápsula fina. A morfometria cística foi examinada em 18 cortes. Os cistos nos músculos eram de formato ovoides e medidos 287 x 105  $\mu\text{m}$ . O tamanho da cápsula do cisto tecidual foi cerca de 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura com extremidades polares mais grossas encerrando 100s bradizoítos delgados compactados formando o padrão espiralado (ELSHEIKHA et al., 2006).

Na metodologia empregada por Lúcio et al., (2020) para o diagnóstico histológico foram utilizados tecidos fixados em formalina e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram analisadas separadamente por dois investigadores. Gatos contendo pelo menos um sarcocisto morfologicamente compatível com *Sarcocystis* spp. dentro de pelo menos uma seção de tecido foram considerados histologicamente positivos. Os casos em que não foram observados sarcocistos foram considerados histologicamente negativos.

Hammerschmitt et al., (2020) descreveram um caso de um gato no Brasil com lesões restritas ao encéfalo, na substância cinzenta e branca e se estendendo até as leptomeninges, havia um infiltrado inflamatório composto por neutrófilos degenerados, macrófagos e linfócitos. Essas áreas eram frequentemente associadas a estruturas parasitárias medindo 10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro (esquizontes), que continham numerosas estruturas alongadas medindo cerca de  $1,5 \times 4$   $\mu\text{m}$  (merozoítos), morfologicamente compatíveis com *S. neurona*.

Gareh et al., (2020) na pesquisa realizada em camelos (*Camelus dromedarius*) observaram sarcocistos de formato irregular dentro das fibras musculares do esôfago, diafragma e coração. Os cistos continham vários basófilos e bradizoítos. Não identificaram alterações degenerativas ou inflamatórias nesses tecidos; mas notaram que havia infiltração de células inflamatórias ao redor de um único sarcocisto em um esôfago na musculatura do esôfago.

Chauhan et al., (2020) realizaram exame histopatológico dos tecidos infectados de suínos domésticos (*Sus scrofa*) na Índia, observou-se variação no tamanho (pequeno para grande) e na forma (redondo, oval, alongado, reto e cilíndrico) dos sarcocistos. A parede externa do cisto era muito espessa e circundada por numerosos bradizoítos em forma de banana, porém a presença de sarcocistos não produziu reação inflamatória grave e/ou necrose em nenhum dos órgãos examinados.

Latif et al., (2010) investigaram a infecção por *Sarcocystis* spp. em 20 mamíferos selvagens necropsiados em cativeiro e 20 aves em 2 zoológicos na Malásia. Cistos microscopicamente visíveis foram detectados em 8 animais (8/40; 20%). Não foram observados cistos macroscópicos em nenhum dos animais. Os cistos eram alongados ou circulares com tamanho médio de  $254 \times 24,5 \mu\text{m}$ . A parede tinha  $2,5 \mu\text{m}$  de espessura. Parecia haver 2 estágios reconhecíveis; ou seja, os metrócitos periféricos e os merozoítos centrais em forma de meia-lua. Não houve infiltração leucocitária presente no tecido muscular adjacente.

### 2.1.3 *Sarcocystis* spp. em outras espécies

O gênero *Sarcocystis* spp. acomete várias espécies animais, como mamíferos, aves e répteis. As aves podem servir de alimento para os gatos. Embora o papel das aves no ciclo epidemiológico das parasitoses seja desconhecido, as aves podem ser expostas à infecção pois consomem alimentos e água em contato com o solo e, além disso, as aves carnívoras e onívoras se alimentam de carcaças aumentando a probabilidade de ingestão de cistos e oocistos de parasitas. Outra característica das aves é que a maioria tem comportamento migratório que pode contribuir com a disseminação de *Sarcocystis* spp. em todo o mundo. Outra característica das aves é que a maioria tem comportamento migratório que pode contribuir com a disseminação de *Sarcocystis* spp. em todo o mundo (ALVES, 2022).

O gado é hospedeiro intermediário de várias espécies de *Sarcocystis*: aliás, além do *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*, pelo menos quatro novas espécies foram recentemente identificadas em músculo bovino: *S. bovifelis*, *S. rommeli*, *S. bovini* e *S. heydorni* (RUBIOLA et al., 2018). Seis espécies de *Sarcocystis* utilizam gado (*Bos taurus*) como hospedeiro intermediário, duas das quais, *S. hominis* e *S. heydorni*, são zoonóticos (PRAKAS et al., 2020), podem infectar humanos através do consumo de carne crua ou mal cozida (RUBIOLA et al., 2021).

É prevalente em pequenos ruminantes como ovinos e caprinos em todo o mundo causando impactos patogênicos que levam a perdas econômicas devido à carcaça condenação, aborto e morte (SWAR et al., 2021).

A mieloencefalite protozoária equina (EPM) é uma doença infecciosa que possui como principal agente o protozoário *Sarcocystis neurona*. O parasita acomete o sistema nervoso central de equinos podendo causar alterações neurológicas como ataxia, paresia, atrofia muscular e alterações de estado mental (FANTINI et al., 2021). Assim como os asininos também podem ser acometidos pela ocorrência e formação de cistos na medula espinhal e sistema nervoso central de merozoítos de *Sarcocystis neurona* (VILELA et al., 2019). Cavalos brasileiros foram considerados reativos ao antígeno do tipo *S. falcatula*; no entanto, é desconhecido se os cavalos são naturalmente expostos a *S. falcatula* ou se a soropositividade em cavalos resultou de reatividade cruzada com outros *Sarcocystis* spp. (GONDIM et al., 2021).

O equino é o hospedeiro accidental e o vetor do protozoário é o gambá (hospedeiros definitivos) (TEIXEIRA et al., 2019). Pelo menos quatro *Sarcocystis* spp. (*S. falcatula*, *S. neurona*, *S. lindsayi* e *S. speeri*) utilizam gambás (*Didelphis* spp.) como hospedeiros definitivos, e dois deles, *S. neurona* e *S. falcatula*, são conhecidos por causar doenças em cavalos e aves, respectivamente (GONDIM et al., 2021).

Ye et al., (2018) relataram pela primeira vez a presença de cistos de *Sarcocystis* no tecido muscular de dois cães domésticos (*Canis familiaris*), em 37 amostras, na China, que normalmente servem como hospedeiros definitivos para o parasita. O fato é algo incomum e pouco frequente. Segundo Labruna et al., (2006) os cães que podem exercer o hábito de se alimentarem de carne crua, por meio da caça de pequenos mamíferos e pássaros ou pelo fornecimento de carnes e vísceras crudas ou mal cozidas (as quais podem conter cistos musculares viáveis), apresentam um maior risco de infecção pelo protozoário.

## 2.1.4 Aspectos zoonóticos

A sarcocistose é uma doença zoonótica relacionada a protozoários com um amplo espectro de hospedeiros intermediários (YUKSEK et al., 2022), com uma distribuição geográfica mundial (ABDULLAH, 2021).

Algumas espécies de *Sarcocystis* são patogênicas e a distribuição desses parasitos entre os animais domésticos pode afetar negativamente a saúde humana e animal (JANUSKEVICIUS et al., 2019). *S. hominis*, *S. heydorni* e *S. suis* usam humanos como hospedeiros definitivos e são responsáveis pela sarcocistose intestinal no hospedeiro humano (ROSENTHAL, 2021), que costuma ser autolimitada, mas os esporocistos podem ser excretados por meses (DUBEY, 2015).

Em humanos, a doença é adquirida pela ingestão de carne contaminada com cistos zoonóticos do protozoário *Sarcocystis* na musculatura de bovinos e suínos envolvido após o consumo de carne infectada (QUADROS et al., 2019). Náusea e vômito podem ocorrer três dias após o consumo de carne infectada; esses sintomas são considerados devido a substâncias tóxicas nos sarcocistos. Diarreia e dor abdominal estão associadas à excreção de esporocistos esporulados nas fezes humanas, geralmente de 8 a 14 dias após a ingestão de carne infectada (DUBEY, 2015).

Os seres humanos servem como hospedeiros intermediários para *Sarcocystis nesbitti*, uma espécie com hospedeiro definitivo reptiliano, e possivelmente outras espécies não identificadas, adquiridas pela ingestão de esporocistos de alimentos ou água contaminados com fezes e do ambiente; as infecções têm uma fase inicial de desenvolvimento no endotélio vascular, com doença de difícil diagnóstico; Os sinais clínicos incluem febre, cefaleia e mialgia. O desenvolvimento subsequente de cistos intramusculares é caracterizado por miosite (FAYER et al., 2015).

Abubakar et al., (2013) relataram um surto de infecção sintomática por *Sarcocystis nesbitti* na Malásia. Foram identificados 89 casos sintomáticos com início de febre (94%), mialgia (91%), cefaleia (87%) e tosse (40%) ≤26 dias após o retorno. Em pessoas que tiveram febre. Alguns pacientes tinham miosite facial distinta.

Agholi et al., (2016) relataram o primeiro caso de sarcocistose intestinal causada por *S. cruzi* em um humano naturalmente infectado, um paciente com AIDS no Irã. O gênero geralmente não é considerado um patógeno entérico importante em pacientes imunocomprometidos, mas espera-se que espécies para as quais os seres humanos são o hospedeiro final (*Sarcocystis hominis* e *Sarcocystis suis*, bem como outras espécies) sejam encontradas cada vez mais frequentemente em pessoas imunodeficientes.

Sintomas como náusea, dor de estômago e diarreia variam muito, dependendo do número de cistos ingeridos, mas parecem mais graves com a carne suína do que com a bovina (FAYER et al., 2015). Náusea e vômitos podem ocorrer dentro de três dias após o consumo de carne infectada; esses sintomas são considerados devido a substâncias tóxicas contidas em sarcocistos ou a outros fatores encontrados na carne crua. Diarreia e dor abdominal estão associados com a excreção de esporocistos esporulados nas fezes humanas geralmente dentro de 8-14 dias após a ingestão de carne infectada (DUBEY, 2015).

Estudos têm demonstrado a ocorrência de *Sarcocystis* em produtos cárneos. Alves et al., (2018) revelaram a presença dos parasitos *Sarcocystis* spp. em amostras de filé mignon bovino, carne moída bovina e salame colonial. Segundo os autores, a detecção de *S. hominis* pode ser um fator de risco para a contaminação humana, através da ingestão de carne crua ou mal cozida que contenham sarcocistos. Porém, a presença do DNA deste protozoário não significa necessariamente potencial de infecção aos humanos, pois cuidados nos processos de fabricação podem reduzir a viabilidade dos cistos.

Gonçalves et al., (2016) analisaram por microscopia óptica, diversos tipos de cortes de carne bovina e evidenciou a presença de cistos de *Sarcocystis* spp, em 100% das amostras pesquisadas. Quadros et al., (2019) em uma pesquisa feita com bovinos abatidos em um frigorífico sob inspeção federal na cidade de Santa Cecília, no estado de Santa Catarina, Brasil. De 146 bovinos, 122 (86,6%) apresentaram cistos de *Sarcocystis cruzi* em tecido cardíaco, cuja espécie foi determinada segundo o critério morfológico (parede fina menos de 1 µm) em lâminas preparadas para histologia e coradas com hematoxilina e eosina, embora nenhuma amostra apresentou cistos microscópicos durante a coleta dos fragmentos para o processo histopatológico.

Espindola et al., (2022) verificaram a soroprevalência de *Sarcocystis* spp. numa pesquisa feita em suínos criados em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Amostras de soro de 84 suínos de 31 fazendas foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (IFA). A frequência de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. foi de 36,9% (31/84), com títulos variando de 32 a 1.024. Adicionalmente, 53 amostras de embutidos suínos e tecidos cárneos destinados ao consumo humano, incluindo: salame, linguiça, morcela, coração, língua, cérebro e músculo da costela foram submetidas à PCR para detecção de DNA. A presença de DNA de *Sarcocystis* spp. foi detectada em 67,9% (36/53) das amostras avaliadas. O que sugere que os suínos foram infectados e podem servir como um importante reservatório e a circulação desse agente na população suína é relevante para a saúde pública devido ao seu potencial zoonótico.

### **2.1.5 Diagnóstico sorológico**

Testes sorológicos são frequentemente utilizados para confirmar a infecção por *Sarcocystis* spp. e também são úteis para avaliação de um grande número de amostras (FERREIRA, 2018). Segundo Ferreira et al., (2020) as técnicas sorológicas podem detectar anticorpos contra *Sarcocystis* spp. em infecções únicas ou mistas e a técnica por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de *Sarcocystis* em soros bovinos.

Para o diagnóstico ante mortem da mieloencefalite equina por protozoário (MEP), a sorologia é a principal ferramenta, uma vez que a detecção direta do parasita é muito difícil antes da necropsia. No entanto, a presença de anticorpos contra *Sarcocystis* spp. indica exposição ao agente, mas não necessariamente persistência da infecção. Há ainda o risco de reação cruzada entre as duas espécies de *Sarcocystis*, devido à proximidade filogenética entre protozoários do mesmo gênero, no momento em que se recorre os testes sorológicos (ANTONELLO et al., 2015).

### **2.1.6 Diagnóstico histopatológico**

Para Rosenthal, (2021) a microscopia óptica é suficiente para diferenciar sarcocistos de paredes espessas de sarcocistos de paredes finas em um determinado hospedeiro, mas o diagnóstico diferencial adicional depende de dados ultraestruturais, pois há diferenças na parede do sarcocisto apenas discerníveis na maior ampliação proporcionada pela microscopia eletrônica ou usando diferenciação genética. Trofozoítos visíveis ou bradizoítos em tecido de biópsia também confirmam o diagnóstico.

Portella et al., (2021) descreveram que todas as amostras de tecidos de ovelha apresentavam cistos grosseiramente visíveis, caracterizados como brancos, de redondos a ovais e estruturas variando de 0,3 a 1 cm de diâmetro. Em contraste, os tecidos de bovinos não

apresentavam cistos grosseiramente visíveis, mas tinham focos branco-amarelos com contornos irregulares, distribuídos aleatoriamente. Todas as amostras de bovinos e ovinos apresentavam cistos microscópicos. No exame histológico de tecidos ovinos foram observadas estruturas basofilicas circulares a alongadas, encapsuladas, variando de 30 a 3.000 µm de comprimento e 20 a 1.000 µm de largura dentro das fibras do músculo esquelético. Nos tecidos de bovinos, todos os quatro fragmentos de músculo cardíaco analisados continham estruturas basofilicas circulares a alongadas, dentro dos cardiomiócitos e em algumas fibras de Purkinje. Além de Infiltrado inflamatório misto discreto contendo neutrófilos, histiócitos, linfócitos e plasmócitos é observado no tecido cardíaco juntamente com cardiomiócitos e adipócitos, indicando sarcocistose miocárdica.

### 2.1.7 Diagnóstico molecular

Atualmente, métodos moleculares podem ser usados para caracterizar *Sarcocystis* spp., identificar seus sarcocistos e determinar suas relações filogenéticas (GJERDE et al., 2020). Até recentemente, a identificação de espécies moleculares de vários *Sarcocystis* spp. baseou-se quase exclusivamente em sequências da unidade nuclear de rDNA, particularmente o rRNA 18S (RUBIOLA et al., 2018). Testes moleculares proporcionam a detecção e caracterização de espécies de *Sarcocystis* (FERREIRA, 2018). A PCR em esporocistos pode ser usada para determinar as espécies presentes em hospedeiros (LINDSAY & DUBEY, 2020).

Antes da era molecular, sarcocistos morfologicamente indistinguíveis em diferentes hospedeiros intermediários só podiam ser atribuídos a diferentes espécies com base em experimentos de transmissão, que exigiam que os hospedeiros definitivos também fossem conhecidos. Atualmente, métodos moleculares podem ser usados para caracterizar *Sarcocystis* spp., identificar seus sarcocistos e determinar suas relações filogenéticas (GJERDE et al., 2020). Todos os gatos positivos na histopatologia também foram positivos para PCR (5/5; 100%). Análise comparativa das sequências disponíveis em GenBank NCBI revelou maior identificação com *S. neurona* (AH009986.2), com 98–100% de similaridade em todos os casos (5/5; 100%). Os restantes 95 gatos foram PCR-negativos (LÚCIO et al., 2020).

Recentemente, pesquisadores obtiveram sucesso notável em aspectos moleculares para identificar várias espécies de *Sarcocystis* spp que infectam o gado. Várias técnicas moleculares avaliadas para este fim são 18S rRNA, 28S rRNA, 18S rDNA, gene da subunidade 1 da citocromo C oxidase mitocondrial (COX1) e região ITS-1. Geralmente, o *Sarcocystis* características ultraestruturais são consideradas fundamentais para a identificação de muitos *Sarcocystis* spp. dentro do mesmo hospedeiro intermediário. Atualmente, a análise da sequência genômica é necessária para esclarecer se morfologicamente *Sarcocystis* semelhantes de diferentes hospedeiros intermediários são da mesma espécie ou não (SHNAWA; SWAR, 2021).

### 2.1.8 Controle e Prevenção

Gatos de propriedades rurais não devem ser alojados em depósitos de rações ou ter acesso a eles, nem se deve permitir que defequem em locais de estabulação de animais de interesse zootécnico. É importante também que não sejam alimentados com carne sem ser cozida (FERREIRA, 2016). O gado morto deve ser enterrado ou incinerado e animais mortos nunca devem ser deixados no campo para abutres e carnívoros comerem (LINDSAY & DUBEY, 2020).

Para Quadros et al., (2019) a educação sanitária e o conhecimento da população são fundamentais e devem ser disseminados para que as medidas profiláticas sejam realizadas, principalmente na região sul do Brasil onde o consumo, principalmente do churrasco é comum e muitas pessoas ainda mantém o hábito da ingestão de carne mal passada, aumentando a chance de infecção. É altamente recomendável que medidas de higiene sejam aplicadas durante o processamento da carne e o consumo de produtos cárneos mal cozidos deve ser evitado (MAKY E MOHAMMED, 2021).

Para evitar sarcocistose humana, a carne deve ser congelada a - 20°C por um dia ou a - 4°C por 2 dias e cozida a uma temperatura de 70°C antes do consumo, assim como os seus produtos (MAKY e MOHAMMED, 2021). Cozinhar a carne antes de servir aos cães inabilita o protozoário. A cocção das carnes bovina e suína, a fiscalização das carnes nos abatedouros, o uso de adubos que não sejam dejetos humanos e a não poluição fecal do solo constituem, também, medidas de prevenção da sarcocistose (QUADROS et al., 2019).

Para evitar a ocorrência de Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP), Teixeira et al., (2019) recomenda bloquear o acesso de gambás ao estábulo e dependências, boa higiene referente ao armazenamento e manipulação das rações dos animais, bebedouros e cocheiras, requisitando exames e histórico dos novos animais que serão introduzidos na propriedade, pode ser uma prevenção da doença. Deve-se, portanto, evitar situações de estresse e imunossupressão que possam desencadear a sintomatologia nervosa, especialmente se os animais forem criados em áreas onde estejam presentes gambás, que são os hospedeiros definitivos do *S. neurona*, servindo de fonte de infecção para os equinos, através da eliminação de oocistos em suas fezes (VILELA et al., 2019).

## 2.2 *Neospora caninum*

*Neospora caninum* antes de 1984 era erroneamente identificado como *Toxoplasma gondii*. Os cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* têm paredes mais finas (<0,5 µm) e podem ser encontrados em muitos órgãos. Um novo gênero, *Neospora*, foi proposto para acomodar a espécie *N. caninum* porque se considerou que o parasito não se encaixava nos gêneros existentes (DUBEY et al., 2002). Já foi diagnosticado em várias espécies que acabam sendo hospedeiros intermediários como, asininos, equinos, cervídeos, gatos, galinhas, búfalos, bovinos, caprinos e ovinos (SILVA et al., 2019).

É um protozoário intracelular obrigatório que infecta animais domésticos e silvestres (BARROS et al., 2018). Possui canídeos domésticos e selvagens, coiotes e lobos cinzentos como hospedeiros definitivos e vários animais de sangue quente como hospedeiros intermediários (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017). Os canídeos são considerados hospedeiros definitivos, pois podem liberar oocistos no ambiente por meio de suas fezes (BARROS et al., 2018).

### 2.2.1 Ciclo biológico, transmissão e patogenia

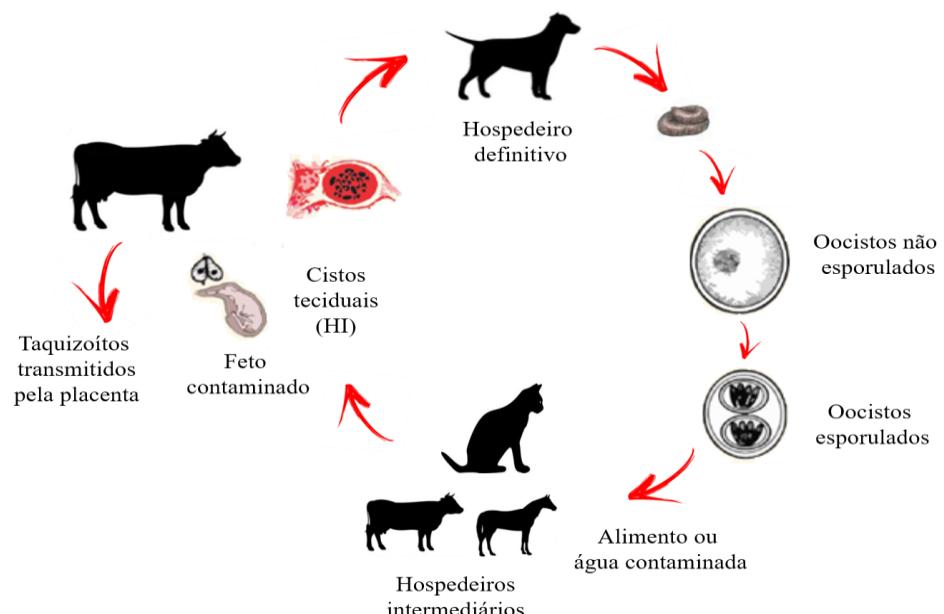
É um parasito intracelular obrigatório e possui um ciclo heteroxeno (Figura 1) (GONDIM, et al., 2002). Devido a sua semelhança com outro coccídio da mesma família, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* só teve seu ciclo de vida elucidado em 1998 (McALLISTER et al., 1998).

Os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), o lobo cinzento (*Canis lupus lupus*), os coiotes (*Canis latrans*), e o dingo (*Canis lupus dingo*) são hospedeiros definitivos (SILVA et

al., 2019). Enquanto ruminantes, como bovinos (*Bos taurus*), ovelhas (*Ovis aries*) e veados (*Cervidae*) servem como hospedeiros intermediários (KLEIN et al., 2019).

Todos os três estágios infecciosos de *N. caninum* (taquizoítos, bradizoítos e oocistos) estão envolvidos na transmissão do parasito. Os carnívoros provavelmente se infectam pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos, e os herbívoros provavelmente se infectam pela ingestão de alimentos ou água potável contaminados por oocistos esporulados. A infecção transplacentária pode ocorrer quando os taquizoítos são transmitidos de uma mãe infectada para o feto durante a gravidez (DUBEY et al., 2007).

Os esporozoítos quando ingeridos por um hospedeiro intermediário, são liberados e se transformam em taquizoítos, que são capazes de proliferar e se disseminar para diferentes órgãos. Esta fase terminará quando o hospedeiro desenvolver uma resposta imune protetora, causando a transformação de taquizoítos em bradizoítos de proliferação mais lenta, que se desenvolvem dentro do cisto tecidual, geralmente confinado ao tecido nervoso e músculo esquelético, a fim de estabelecer a fase persistente da infecção (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Neospora caninum*. Fonte: Adaptado de Dubey (2003) e Alves (2022).

A transmissão do *N. caninum* pode ocorrer por duas vias: via horizontal ou vertical. A primeira não menos importante pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados pelo hospedeiro intermediário, que foram excretados nas fezes por cães infectados, já a transmissão vertical acontece da mãe para o feto pela via transplacentária (DUBEY e SCHARES, 2011).

A transmissão vertical é a principal via de *N. caninum* em bovinos. Como consequência, ela desempenha um papel importante na manutenção do agente por propagação sucessiva do parasito de uma geração para outra (JAPA et al., 2019). A transmissão transplacentária em bovinos é responsável por perpetuar a doença no rebanho (COSTA et al., 2021). No entanto, ela por si só não é capaz de propagar a infecção por *N. caninum* na natureza (DUBEY et al., 2009).

A transmissão horizontal é de notável importância, pois estima-se que um único hospedeiro definitivo seja capaz de eliminar, aproximadamente, 500.000 oocistos após a ingestão de uma única carcaça contaminada, o que seria suficiente para infectar milhares de animais em um rebanho (GONDIM et al., 2002).

Os canídeos podem adquirir infecção por ingestão de tecidos infectados (LINDSAY E DUBEY, 2020). O contato direto entre cães e bovinos em instalações ou pastagens, desempenha importante papel na transmissão e manutenção do protozoário nos rebanhos (COSTA et al., 2021).

Os principais fatores que influenciam a patogênese da doença estão relacionados com a invasão do parasito, a replicação e o seu estabelecimento dentro da célula hospedeira e a capacidade do hospedeiro para montar uma resposta imune eficiente para inibir a proliferação e persistência do parasito (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).

### **2.2.2 *Neospora caninum* em felinos**

O papel dos felídeos (domésticos e não domésticos) no ciclo de vida de *N. caninum* tem sido pouco descrito (NAZARI et al., 2023). Pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção por *Neospora caninum* em gatos (RECHE-JÚNIOR et al., 2022). Segundo Dubey et al., (2007) embora anticorpos para *N. caninum* tenham sido relatados em felídeos domésticos e selvagens, infecções clínicas naturais não foram documentadas. Identificar anticorpos séricos para *N. caninum* pode ajudar a confirmar o diagnóstico de neosporose (DUBEY et al., 2009).

André et al., (2010) analisaram amostras de soro de 142 felídeos silvestres e 19 felinos exóticos de zoológicos. Dos 161 felídeos silvestres testados, 70 (50,3%) foram soropositivos para *N. caninum* pelo teste de imunofluorescência indireta (IFAT). Os títulos de anticorpos variaram de 1:25 a 1:400.

Onuma et al., (2014) observaram uma prevalência de 63,6% no estudo feito com onças-pintadas (*Panthera onca*), de vida livre. De onze amostras, sete foram positivas para a espécie *N. caninum*, o que indicou a circulação ambiental desse patógeno na região do Pantanal do Estado de Mato Grosso. Eles utilizaram a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para investigar a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* em amostras de soro de onças-pintadas (*Panthera onca*), de vida livre e verificou a exposição a esse coccídio relacionado.

Ebani et al., (2021) testaram 95 amostras de soro para *N. caninum* em gatos da Toscana, região central da Itália. Apenas 2 (2,1%) foram positivos na titulação de 1:20. Segundo os autores, a baixa ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* sugeriram que os gatos selecionados (principalmente jovens), embora vivessem ao ar livre, não estavam acostumados a se alimentar de suas presas.

Yang et al., (2022) analisaram 128 amostras de soro de gatos errantes da China por meio de testes sorológicos específicos para *N. caninum*, em que 2 (1,6%) foram positivas para IgG e 74 (57,8%) para IgM. A maioria dos relatos de neosporose do Brasil são relacionados à sorologia (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017).

Os trabalhos sobre a ocorrência de *Neospora caninum* em gatos, publicados no Brasil estão na tabela 2. Dubey et al., (2002) foram os primeiros a documentar que gatos domésticos brasileiros oriundos de São Paulo foram expostos naturalmente a *N. caninum*. Anticorpos para *N. caninum* foram encontrados em 60 (11,9%) de 502 gatos com títulos de 1:40 em 36 gatos, 1:80 em 18 gatos, 1:160 em 5 gatos e 1:800 em 1 gato usando o *Neospora* teste de aglutinação (NAT). Foram confirmados por Western blotting no soro de 10 gatos com títulos de NAT de 1:80 a 1:800; o que sugeriu que pelo menos 10 gatos tinham anticorpos específicos para *N. caninum* confirmados por 2 testes.

**Tabela 2** Trabalhos sobre a ocorrência de *Neospora caninum* em gatos, publicados no Brasil.

Estado	Método	Nº amostras	Resultados	Referências
São Paulo	NAT	502	60 (11,9%)	Dubey et al., (2002)
São Paulo	IFAT	400	98 (24,5%)	Bresciani et al., (2007)
São Paulo	IFAT	70	0	Coelho et al., (2011)
Maranhão	IFAT	200	54 (27%)	Braga et al., (2012)
Paraíba	RIFI	201	0	Feitosa et al., (2014)
Bahia	IFAT	272	8 (2,9%)	Meneses et al., (2014)
Mato Grosso do Sul	IFAT	151	10 (6,6%)	Sousa et al., (2014)
Pernambuco	IFAT	35	5 (5,7%)	Arraes-Santos et al., (2016)
Bahia	IFAT	231	50 (44,7%)	Munhoz., et al., (2017)
Pernambuco	NAT	257	8 (3,11%)	Lima et al., (2018)
Roraima	RIFI	32	5 (15,62%)	Gomes et al., (2019)
Paraná	IFAT	100	42 (67,7%)	Koch et al., (2019)
Tocantins	IFAT	180	7 (3,9%)	Ribeiro et al., (2022)
Rondônia	IFAT	100	0	Silva et al., (2023)

Bresciani et al., (2007) pesquisaram anticorpos através da Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) em gatos siameses, persas e sem raças indeterminadas do município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. De dos 400 gatos, 98 foram soropositivos para para *N. caninum* (24,5%, título  $\geq 16$ ). Os títulos de anticorpos variaram de 16 a 256. Dos 219 felinos menores de 1 ano, 18,7% eram positivos, enquanto entre os 181 gatos com mais de 1 ano, 31,5% apresentaram soropositividade para o agente. Em outro estudo realizado em São Paulo, Coelho et al., (2011) *N. caninum* (título 16) não foi observado nenhum animal. O estudo utilizou a imunofluorescência indireta em 70 gatos do município de Andradina.

Braga et al., (2012) anticorpos anti-*Neospora caninum* em gatos com acesso ao ar livre em São Luís, Maranhão. A presença de IgG anti-*N. caninum* foi testado usando a RIFI. Dos 200 gatos incluídos no estudo, 54 (27%) foram soropositivos. Os títulos de anti-*N. caninum* variaram de 1:25 (ponto de corte) a 1: 400.

Feitosa et al., (2014) analisaram amostras de sangue provenientes de 201 gatos, 132 domiciliados e 69 errantes no município de Patos, Paraíba, Brasil. Eles utilizaram 1:50 como ponto de corte, mas a presença de *N. caninum* não foi observada nos animais estudados, pois nenhum animal foi sororreagente.

Meneses et al., (2014) testaram 272 felinos, na qual 134 gatos errantes e 138 de gatos domiciliados pela RIFI, utilizando-se como antígeno, merozoítos produzidos em cultura celular. Os soros dos felinos foram testados para anticorpos contra o protozoário *N. caninum*, cuja frequência foi de 2,9% (8/272). Nenhuma diferença significativa foi observada entre gatos errantes e domiciliados. Todos os gatos soropositivos para *N. caninum* tiveram títulos de 1:50.

A soropositividade não mostrou nenhuma diferença significativa entre gatos internos errantes e domiciliados.

Sousa et al., (2014) encontraram anticorpos IgG anti-*N. caninum* em 10 (6,6%) de 151 gatos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Gatos domésticos (65 gatos errantes e 86 gatos domiciliados; 55 machos e 96 fêmeas, de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os títulos de anticorpos IgG variaram de 1:50 a 1:200 e os autores aconselham veterinários incluir *N. caninum* no diagnóstico diferencial de gatos apresentando sintomas clínicos neurológicos.

Arraes-Santos et al., (2016) demonstraram, por meio da RIFI que gatos com acesso à rua em São Luís, Maranhão, são expostos ao *N. caninum*. De 35 gatos testados, 5,7% (5/35), foram sororreagentes. Munhoz., et al., (2017) investigaram também pela RIFI um total de 231 gatos no estado da Bahia. Foram considerados o ponto de corte de 1:50 e 50 (44,7%) gatos apresentaram. De 201 gatos domiciliados e 30 gatos errantes. Para *N. caninum*, a soropositividade entre gatos com dono foi de 21,4% (43/201) e entre os gatos de rua, 23,3% (7/30).

Lima et al., (2018) examinaram amostras de soro de 257 gatos selvagens da ilha de Fernando de Noronha. Foram analisadas através do teste de aglutinação *Neospora* (NAT) para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum*. Das amostras de soro analisadas, 8 (3,11%) foram positivas. Segundo os autores os resultados demonstraram que os gatos selvagens estão expostos a infecção por *N. caninum* em baixa frequência.

No estudo realizado por Gomes et al., (2019) no estado de Roraima, um total de 32 gatos foram submetidos a exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG *Neospora caninum* por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerando um ponto de corte para positividade a diluição de 1:25. Foi encontrado uma porcentagem de 5 (15,62%) de animais positivos e 27 (84,38%) negativos. Koch, (2019) relatou a presença de anticorpos IgG contra *Sarcocystis neurona* e *Neospora caninum* em gatos de Curitiba, no Paraná. Das 100 amostras de soro de gatos, 42 (67,7%) foram positivas.

Silva et al., (2023) em um levantamento soroepidemiológico de anticorpos anti-*Neospora caninum* em gatos domésticos (*Felis catus*) no estado de Rondônia foram avaliadas amostras de soro sanguíneo de 100 gatos de diferentes regiões e considerado um ponto de corte 1:50 de anticorpos, mas não houve ocorrência de gatos soropositivos.

### 2.2.3 *Neospora caninum* em outras espécies

Neosporose é uma doença parasitária que acomete uma variedade de mamíferos, dentre esses os bovinos, que quando infectados podem apresentar como principais sintomas distúrbios reprodutivos que levam a perdas econômicas significativas para a pecuária de leite e corte (BRILHANTE et al., 2022). Segundo, Cerqueira-Cézar et al., (2017) em revisão feita sobre neosporose fica evidente que a infecção por *N. caninum* é amplamente prevalente em todo o Brasil. No entanto, nada se sabe sobre a prevalência de oocistos desse protozoário no solo ou nas fezes caninas e que também é incerto se existem hospedeiros definitivos adicionais, além do cão doméstico e alguns canídeos silvestres, como afirmado anteriormente.

Quando a infecção por *N. caninum* ocorre em bovinos, ela induz aborto, sendo a neosporose bovina uma das principais causas de aborto em todo o mundo. No gado leiteiro, o ônus econômico do aborto associado à neosporose é tão grande que pode resultar no fechamento de uma fazenda (ALMERIA et al., 2017). Segundo Berná et al., (2022) o impacto econômico mundial pode ser estimado em um bilhão de dólares anualmente (BERNÁ et al., 2022). No entanto, nem todas as vacas infectadas abortam e ainda não se sabe por que isso ocorre (ALMERIA et al., 2017).

Apesar da neosporose não ser considerada uma das principais enfermidades relacionadas a perdas gestacionais na espécie equina (OCTAVIANO et al., 2020). Para Cabral (2020) a transmissão transplacentária de *Neospora* spp. ocorre em éguas, pois o parasita foi encontrado em tecidos placentários. Foi possível observar cistos na placenta de alguns animais através do exame histopatológico e outros animais foram positivos através do PCR da placenta, enquanto outros do líquido amniótico.

É necessária a inclusão desse agente etiológico no rol de exames a serem realizados nos casos de abortamento e natimortalidade em equinos visto que a presença de cães e a criação conjunta de diferentes espécies em propriedades rurais brasileiras são extremamente comuns, o que pode contribuir para a disseminação da afecção (OCTAVIANO et al., 2020).

Mazuz et al., (2020), demonstraram alta soroprevalência de *Neospora* spp. em éguas que sofreram abortos e altas taxas de transmissão transplacentária para fetos abortados atribuídos a *N. caninum*. A soroprevalência encontrada em éguas abortadas foi de 70,9% e a prevalência por detecção de DNA nos fetos abortados foi de 41,9%. Eles sugerem que *N. caninum* pode ser uma causa significativa de aborto em equinos, os resultados aqui apresentados demonstram que a transmissão transplacentária em equinos tem papel importante na circulação e na epidemiologia desses parasitos.

Infecções por *N. caninum* também foram detectadas em animais selvagens, evidenciando a capacidade do parasita de circular entre animais domésticos e selvagens (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). Embora o papel das aves no ciclo epidemiológico da neosporose seja desconhecido, as aves estão expostas à infecção porque se alimentam no solo e podem, assim, contribuir para a disseminação do parasita (BARROS et al., 2018).

Alves et al., (2022) mencionaram que *N. caninum* foi detectado em duas aves (02/65; 3,07%), em amostra de cérebro de *Rupornis magnirostris* e em amostras de cérebro e coração de *Dendrocygna bicolor* DNA do gênero *Sarcocystis* spp. foi detectado em três aves (03/65; 4,62%), sendo que no sequenciamento genético foram identificados *Sarcocystis* spp. em cérebro de *Nymphicus hollandicus* e *Sarcocystis speeri* em cérebro e coração de *Amazona aestiva*. As aves são relevantes no ciclo de vida e epidemiologia dos protozoários devido à grande variedade de espécies de aves, hábitos alimentares e migratórios.

De acordo com Huertas-López, (2022) *N. caninum* não é um patógeno zoonótico, mas Cunha, (2013) em seus resultados obtidos, indicaram a exposição de seres humanos a *N. caninum*, com prevalência mais elevada em indivíduos imunocomprometidos, sendo que anticorpos para esse coccídio foram encontrados em 36 pacientes HIV-positivos (23,1%) e em 11 indivíduos HIV-negativos (11%). Das 256 amostras de soros humanos analisadas, 47 (18,3%) foram positivas para *N. caninum*, no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com a diluição inicial de 1:25.

No estudo feito por Oshiro et al., (2015) para investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em indivíduos imunocomprometidos, a soropositividade avaliada pela reação de anticorpos imunofluorescentes (RIFI) com diluição de 1:50, foi de 26,1% (81/310) em Mato Grosso do Sul e 31,2% (10/32) no Paraná. Devido ao seu sistema imunológico fraco, as pessoas imunocomprometidas podem ser propensas a infecções oportunistas. Para os autores esses dados iniciais sinalizam a necessidade de determinar se esta doença é apenas uma doença oportunista em pessoas imunocomprometidas ou se é uma zoonose.

## 2.2.4 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico de neosporose geralmente depende de sorologia ou detecção de protozoários em fluidos corporais (DECÔME et al., 2019). A prevalência pode variar bastante, dependendo do tipo de amostragem, das técnicas laboratoriais utilizadas, que são variadas e do ponto de corte escolhido na sorologia (SILVA et al., 2019).

Mediante diagnóstico sorológico feito por Adhami et al., (2020) Os anticorpos *N. caninum* IgG foram detectados em 4,86% (n=14/288) e 4,21% (n=4/95) dos soros de cão e raposa, respectivamente. No total, 4,72% (n=7/148) e 5% (n=7/140) cães fêmeas e machos foram sorologicamente positivos, respectivamente em Sanandaj, Província do Curdistão, Irã.

Segundo Murakami et al., (2017) o método RIFI apesar de ser considerado padrão-ouro para o diagnóstico de neosporose, pode-se apresentar negativo mesmo quando o hospedeiro estiver parasitado, com isso aumenta a importância de novos métodos diagnósticos. As respostas imunes humorais não são protetoras contra *N. caninum*, mas a soropositividade e o nível de anticorpos podem ser bons marcadores para o diagnóstico de neosporose bovina e seu risco de aborto associado (ALMERÍA et al., 2017).

Nazari et al., (2020) A o todo, 157 amostras de soro de roedores (101 *Meriones persicus*), (41 *Mus musculus*) e 15 *Cricetulus migratorius*) foram analisadas pelo o método RIFI para anticorpos para *N. caninum*. Foram encontrados uma prevalência de 20,38% (32/157). As amostras de soro foram diluídas em 1:40, 1:50 e 1:80 em PBS e um título de pelo menos 1:50 foi considerado um resultado positivo.

## 2.2.5 Diagnóstico histopatológico

Para Dubey et al., (2019) a biópsia do músculo afetado pode produzir um diagnóstico definitivo quando os organismos são detectados, embora taquizoítos de *N. caninum* sejam semelhantes aos taquizoítos de *T. gondii* sob microscopia de luz, os cistos teciduais de *N. caninum* possuem paredes mais espessas que as do *T. gondii*.

Melendez et al., (2021) em estudo feito com fetos abortados identificaram no exame histopatológico de um feto identificado como um, miosite linfohistiocítica multifocal leve e miocardite em língua, músculo esquelético e coração. Encefalite multifocal leve não supurativa com nódulos gliais em todo o cérebro. No feto dois não foram observadas lesões significativas. Nos tecidos do feto, seções de placenta apresentaram infiltrados aleatórios de neutrófilos e macrófagos em cortes placentários. Para confirmar ainda mais o diagnóstico, a imuno-histoquímica (IHC) foi realizada em seções de tecido do cérebro, músculo esquelético e coração do feto 1 e seções de tecido do cérebro, língua e coração de feto 2. Imunocoloração positiva foi observada em cortes de músculo esquelético e coração do feto 1 e cortes de coração do feto 2.

Prakas et al., (2020) caracterizaram morfologicamente através da microscopia de luz sarcocistos isolados de gaivotas da Lituânia e indicaram que *S. columbae*, *S. halieti*, *S. lari* e *S. wobeseri* são indistinguíveis com base no tamanho de sarcocistos e bradizoítos, bem como a espessura da parede. Os sarcocistos eram microscópicos, semelhantes a fios, 2860–7930 × 43–200 µm de tamanho, com um fino (0,7–1,5 µm), parede cística aparentemente lisa, divididos por septos em compartimentos preenchidos com bradizoítos em forma de banana, 5,5–9,0×1,2–2,4 µm de tamanho.

Costa et al., (2021) relataram na avaliação histopatológica em bovinos de leite no sul de Santa Catarina as seguintes lesões em cinco fetos: encéfalo com áreas de gliose e necrose do neurópilo, circundada por infiltrado de linfócitos e plasmócitos focal ou multifocal, discreto a moderado, caracterizando encefalite necrotizante mononuclear. Na musculatura esquelética e cardíaca havia infiltrado linfócitos e plasmócitos em miofibras ou em miocárdio, multifocal

discreto, caracterizando miosite e miocardite mononucleares, em quatro e três fetos, respectivamente.

A avaliação microscópica do cérebro e da medula espinhal revelou inflamação difusa, moderada a grave, caracterizada por infiltração perivasicular de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Além disso, áreas multifocais de necrose estavam presentes no fígado, músculos cardíacos e esqueléticos e havia leve inflamação mononuclear. Paniculite grave e dermatite piogranulomatosa também foram observadas. Vários organismos ovoides e arredondados compatíveis com zoítos (taquizoítos e/ou bradizoítos) foram observados no cérebro, fígado, pulmões e lesões cutâneas. Imuno-histoquímica (anticorpo policlonal de cabra; 1:5000, VMRD, Pullman, Washington, EUA) do cerebelo demonstrou imunorreatividade positiva para *N. caninum*. Todos esses achados foram consistentes com um quadro inflamatório séptico devido a infecção disseminada grave por *N. caninum* em cães (DECÔME et al., 2019).

## 2.2.6 Diagnóstico molecular

Técnicas moleculares como PCR são necessárias para confirmar o diagnóstico de um agente infeccioso, o que não foi utilizado em nenhum dos estudos para avaliar a prevalência de *N. caninum* em felinos, talvez devido às limitações éticas do isolamento do parasito em animais vivos (NAZARI et al., 2023). Elas introduzem uma abordagem nova e promissora para a detecção de agentes protozoários em líquido cefalorraquidiano (LCR). Levantando a hipótese de que a PCR em tempo real (rt PCR) pode ser um complemento útil para o diagnóstico de mieloencefalite protozoária equina (EPM) (BERNARDINO et al., 2021). De acordo com Murakami et al., (2017) o método de PCR através de líquor é eficaz para a confirmação diagnóstica da enfermidade.

Melendez et al., (2020) realizaram o diagnóstico molecular para identificar o agente responsável por um surto de aborto em um rebanho leiteiro do Estado da Geórgia, Estados Unidos. Órgãos de fetos abortados, tecidos placentários, foram submetidos a investigação. Os resultados foram positivos para *N. caninum* em todos os três fetos pesquisados. Nenhum outro teste de PCR para agentes infecciosos abortivos foi positivo.

Um total de 96 placenta bovinas foram examinadas para a presença de DNA de *N. caninum*. Nenhum histórico de aborto foi registrado em nenhum dos animais estudados, mas 35 amostras foram positivas para o parasito, correspondendo a uma prevalência geral de 36,5% (JAPA et al., 2019).

## 2.2.7 Controle e prevenção

O controle da doença depende de medidas de gestão na produção. Os programas de controle devem ser adaptados à situação específica, nas quais o diagnóstico sorológico é essencial para identificar a extensão da infecção no rebanho e se a transmissão endógena e/ou exógena estão ocorrendo. As principais medidas de controle para evitar a transmissão endógena devem focar evitar a reativação de bradizoítos em animais infectados, mantendo a biossegurança ideal e evitar fatores estressores que podem favorecer a imunossupressão (MARUGAN-HERNANDEZ, 2017). Para Lindsay & Dubey (2020) em rebanhos onde a prevalência de *N. caninum* for muito alta o descarte dos animais é inviável e antes de decidir-se pelo abate é aconselhável estimar a prevalência de *N. caninum* na propriedade.

Lefkaditis et al., (2020) recomendam: quarentena dos animais, testes de reposição, adquirir novas vacas, limitar o acesso de cães as pastagens e rações para evitar possíveis contaminação por fezes e outros potenciais hospedeiros definitivos, controle regular do abastecimento de água e roedores para eliminar um potencial reservatório de *N. caninum* na pecuária e controle de manejo reprodutivo. Eles sugerem ainda que os produtores podem decidir

remover vacas infectadas ou sua progênie do rebanho. A seleção de animais soronegativos para substituição de reprodutores é outra importante medida de controle (MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2017).

Segundo Semango et al., (2019) a redução da contaminação do ambiente com fezes de cães podem contribuir para reduzir o risco de infecção. Essa abordagem pode ser possível em áreas onde os cães são bem controlados, mas na presença de cães soltos, é provável que seja um desafio evitar a contaminação de áreas de pastagem. As práticas de manejo, como pastoreio restrito também contribuem para reduzir as fontes de infecção, mas requer maiores recursos em termos de mão-de-obra e compra ou coleta de forragem.

Para, Goodswen et al., (2013) a melhor forma de controlar a neosporose do ponto de vista econômico, em relação ao custo-benefício seria a criação de uma vacina que protegesse contra a infecção e a doença clínica. Dias et al., (2014) também reforça a necessidade de implementação de um programa de vacinação, que possa resultar de forma considerável na minimização dos prejuízos econômicos causados pelo abortamento, uma vez que produz resposta sorológica significativa em vacas vacinadas. Ainda não existe vacina para combater a neosporose (DUBEY et al., 2009; XU et al., 2019). Assim, o desenvolvimento de vacinas adequadas para controlar sua infecção e transmissão é urgentemente necessário (XU et al., 2019).

Análise molecular e genotipagem são necessários para diagnóstico de cepas de *N. caninum* e serão úteis para o desenvolvimento de vacinas e para estabelecer a ligação entre os ciclos selvagens e domésticos da doença. Aconselha-se educação pública sobre fatores de risco associados à infecção para agricultores e pessoas rurais (GHAREKHANI et al., 2020).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o protocolo de número 6422250523/2023 (ID 002533) tornou a submissão invalidada, não tendo necessidade de aprovação, pois a proposta está fora do escopo da legislação pertinente por se tratar de amostras cedidas (Anexo A).

#### **3.2 Origem das amostras**

As amostras obtidas para diagnóstico histopatológico e molecular, bem como os dados dos animais inseridos neste estudo foram cedidas pelo Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ (Anexo B). Foram incluídos no estudo, amostras de órgãos reprodutivos de gatos asselvajados que foram submetidos a cirurgia de esterilização. Todos os animais são originários da Ilha Furtada, localizada no município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.

#### **3.3 Localização do estudo**

A análise histopatológica foi realizada no Setor de Anatomia Patológica (SAP) e a análise molecular foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias/Cultivo de Células e Hemoparasitos, ambos laboratórios pertencentes ao Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

#### **3.4 Diagnóstico histopatológico**

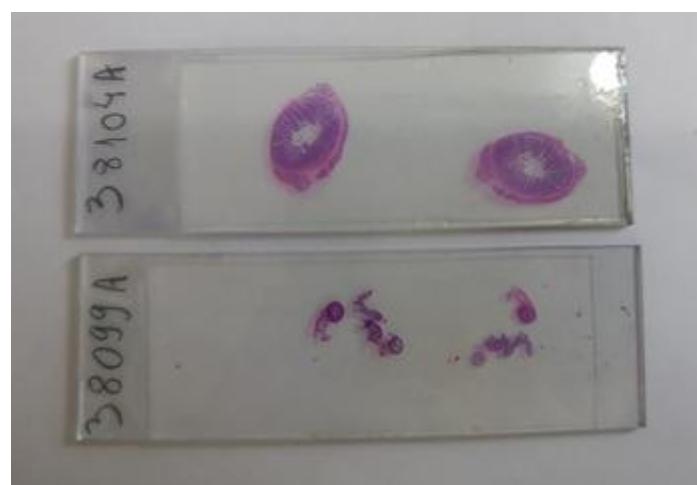
Para o diagnóstico histopatológico foram cedidas 54 amostras, sendo: 54 ovários, 54 tubas uterinas, 54 cornos uterinos, 2 placenta e 22 testículos, que foram clivadas em dimensões longitudinais de 3 mm por 25 mm, apenas os cornos uterinos foram submetidos a cortes transversais de 3 mm. Os fragmentos foram inseridos em cassete histológicos para conservação em álcool absoluto.

Para a confecção das lâminas todos os tecidos foram submetidos ao processamento, bem como: desidratação em álcool absoluto, clarificação pelo xilol PA e infiltradas e impregnadas em parafina e seccionadas a 3  $\mu$ m usando um micrótomo rotativo (Figura 4).



**Figura 3.** Processamento das amostras realizado no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Desidratação em álcool (A). Clarificação pelo xilol (B). Emblocamento pela parafina (C) e Microtomia (D).

Os cortes foram corados com os corantes Hematoxilina e Eosina (HE) (Figura 5). Foram preparadas 109 lâminas, que receberam a identificação conforme o registro do laboratório (38073 a 38126). Para cada animal foram feitas 2 lâminas e em alguns casos, 3 lâminas para uma melhor visualização. Depois de prontas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200, nas objetivas de: 4x, 10x e 40x.



**Figura 4.** Imagem das lâminas de tecidos reprodutivos de gatos confeccionados com o corante Hematoxilina & Eosina e identificadas conforme registro do Setor de Anatomia Patológica da

UFRRJ. Lâmina 38099 A, com ovário, corno uterino e tubas uterinas e Lâmina 38104 A com testículo. Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.5 Diagnóstico molecular**

Para a realização do diagnóstico molecular foram cedidas 63 amostras congeladas em álcool absoluto. Foram utilizados fragmentos de 18 epidídimos, 1 testículo, 23 ovários e 21 úteros, totalizando 63 amostras procedentes de 43 gatos.

#### **3.5.1 Extração de DNA dos tecidos**

Fragmentos de tecidos reprodutivos foram colocados em microtubos de 1,5 ml em solução de digestão (180 µl de PBS, 200 µl de Digest buffer 2X e 20 µl de Proteinase K) na temperatura de 56° C por “overnight” de 16 horas no Agimaxx Thermo-Shaker. Após o período de digestão as amostras foram centrifugadas por 1 minuto e foi adicionado 100 µL de PBS. Para a extração do DNA foi adicionado 500 µL de Fenol-Clorofórmio (25\25) em capela de exaustão. As amostras foram homogeneizadas no agitador Vortex e em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos a 16000 xg. Foram aliquotadas 500 µL do sobrenadante para outro tubo, previamente identificado. Adicionou-se 450 µL de Fenol-clorofórmio e repetiu o processo de homogeneização e centrifugação por 15 minutos a 16000 xg. Retirou-se 450 µL do sobrenadante para outro tubo com cautela para evitar a transferência de fenol e sujidades. Foram adicionados 700 µL de Isopropanol e centrifugados por 4 minutos a 16000 xg. Após observar a formação do “pellet”, o sobrenadante foi descartado. Foi feita a primeira lavagem com 1000 µL de Etanol P.A. gelado e centrifugado por 2 minutos a 16000 xg. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou 1000 µL de Etanol 70% gelado centrifugado por 2 min a 16000 xg. Por último o sobrenadante foi desprezado novamente e o tubo secado com papel toalha e levado a 56°C por 15 minutos para secar o álcool no Agimaxx Thermo-Shaker. Adicionou 100 µL de TE 1X, colocou no Agimaxx Thermo-Shaker a 56°C por 15 minutos, em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer (a -20 ou -80°C) até o momento do uso.

#### **3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Com o propósito de verificar a efetividade da extração de DNA, todas as amostras foram submetidas a uma PCR de triagem para o gene que reconhece a enzima GAPDH (Proteína Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase), encontrado em mamíferos, peixes, aves, coleópteros, répteis, crustáceos e cefalópodes (SARRI et al., 2014).

Foi feito um Master Mix (0,1 µL de Taq polimerase a 0,75U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1 µL de cada iniciador a 0,8 pcomols (GAPDH-F e GAPDH-R), 1 µL de dNTP a 200 mM, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (Promega® MgCl<sub>2</sub> Solution), 2,5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 5,15 µL de água ultrapura livre de DNases, totalizando um volume final de 12,5 µL, contendo 1 µL do DNA extraído.

As reações no termociclador foram realizadas com seguinte protocolo: 95°C por 2 min e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 25 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final). Os produtos extraídos do DNA foram amplificados no termociclador BIO-RAD T100™ Thermal Cycler. A partir da amplificação de todas as amostras para o gene GAPDH, foram empregados protocolos distintos para a detecção de cada protozoário.

### **3.5.3 Protocolo para detecção do gênero *Sarcocystis* spp.**

Utilizou-se o iniciador de COI direto: 5'-TGTACATACTTACGGCAGGT-3' correspondente a posições 11-30 da sequência de *S. bovini* (Nº de acesso do GenBank KT901022.1); ii) primer COI reverso: 5'-CCGTAGGTATGGCGATCAT-3', posições correspondentes 895- 913 da sequência de *S. bovini* (nº de acesso GenBank KT901022.1) (RUBIOLA et al., 2018).

Para a reação foi feito um *Master Mix* de 11  $\mu$ L [0,1  $\mu$ L de Taq polimerase a 0,75U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1  $\mu$ L de cada iniciador a 0,8 pcomols (FLARL e FLALL), 1  $\mu$ L de dNTP a 200 mM, 1,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (Promega® MgCl<sub>2</sub> Solution), 2,5  $\mu$ L de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 3,8  $\mu$ L de água ultrapura livre de DNases], acrescido de 1,5  $\mu$ L do DNA extraído.

As condições finais do ciclo térmico usadas foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação por de 95°C por 1 minuto, anelamento de 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Foram utilizados quatro controles positivos de *Sarcocystis* spp. oriundos de cistos esôfagicos de ovinos e um contole negativo contendo água ultrapura.

### **3.5.4 Protocolo para detecção da espécie *Neospora caninum***

Para diagnóstico de *Neospora caninum*, a região Nc5 (5, 10) foi selecionada como a sequência-alvo para amplificação de DNA, sendo utilizado os iniciadores primer na sequência Np 21plus, 5'-CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC-3' e Np 6plus 5'- TCGCCAGTCAACCT ACGTCTTCT3', com 328 bp (YAMAGE et al. 1996).

Para a reação foi feito um *Master Mix* de 11  $\mu$ L (0,1  $\mu$ L de Taq polimerase) a 0,75U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 1  $\mu$ L de cada iniciador a 0,8 pcomols (FLARL e FLALL), 1  $\mu$ L de dNTP a 200 mM, 1,25  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (Promega® MgCl<sub>2</sub> Solution), 2,5  $\mu$ L de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 4,15  $\mu$ L de água ultrapura livre de DNases, acrescido de 1,5  $\mu$ L do DNA extraído. Sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação por de 95°C por 1 minuto, anelamento de 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos; com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Foram utilizados três controles positivos de *Neospora caninum* oriundos do cultivo celular do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e um contole negativo contendo água ultrapura.

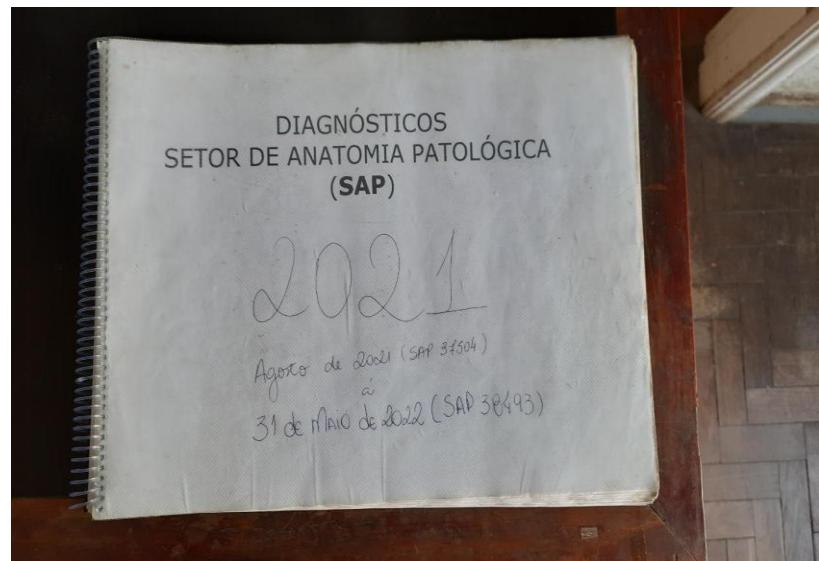
### **3.5.5 Eletroforese e análise dos resultados**

Para ambas as eletroforeses foi usado um volume de 12,5  $\mu$ L dos produtos aplicados em gel de agarose com concentração 1,5% (UltraPureTM LMP Agarose, Invitrogen®). Com o objetivo de avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready To Use - Sinapse Inc - M1071.) Os produtos foram colocados na cuba de eletroforese e as amostras adicionadas em cada poço correspondente, durante 40 minutos a 75 volts e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus).

## 4 RESULTADOS

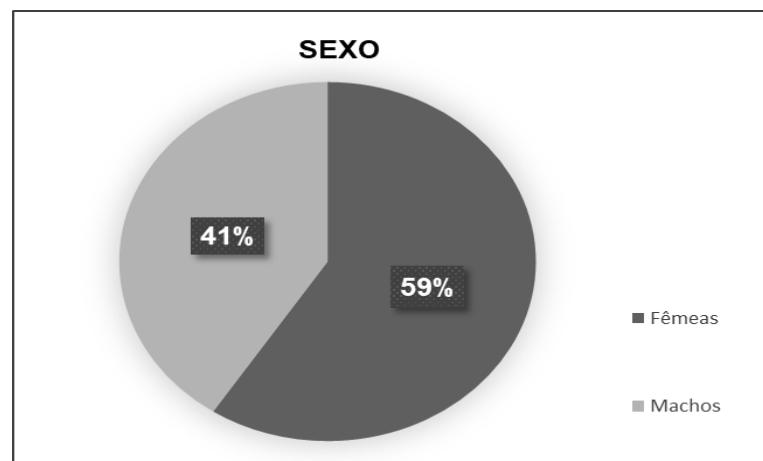
### 4. 1 Levantamento de dados

Os dados obtidos nesse estudo foram cedidos pelo Setor de Anatomia Patológica (SAP), através do livro de registro de diagnóstico (Figura 6). Foram descritos os dados dos gatos, tais como: registro no laboratório, de numeração 38073 a 38126, sexo, faixa etária, raça e tipo de amostra.

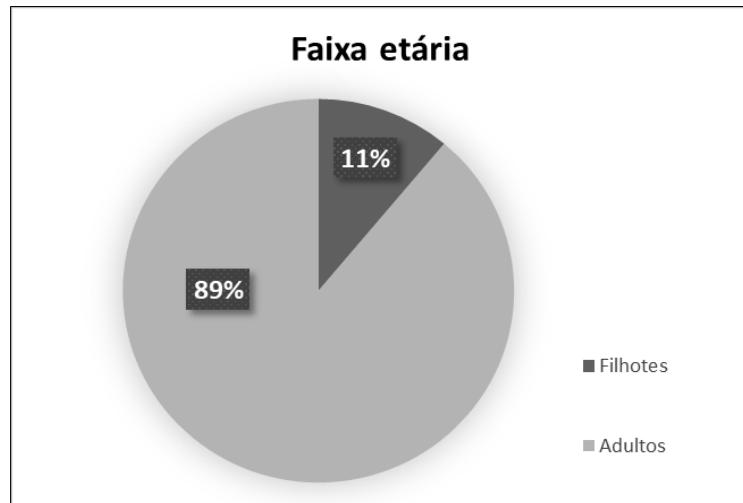


**Figura 5.** Livro de diagnósticos do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, referente a registros (37504 a 38493) do mês de agosto de 2021 a maio de 2022. Arquivo de onde foram retirados os dados dos animais inseridos na pesquisa.

Em relação ao sexo dos animais, foram observados a ocorrência de 59% (32/54) de fêmeas e 41% (22/54) de machos, representados na Figura 7. Quanto à raça dos gatos, 100% (54/54) foram registrados como sem raça definida (SRD). Foi observado que 11% (6/54) são filhotes e os demais, são adultos, contabilizando 89% (48/54) no total como demonstrado na Figura 8.



**Figura 6.** Representação gráfica da porcentagem dos gatos por sexo.



**Figura 7.** Representação gráfica do número de felinos por faixa etária.

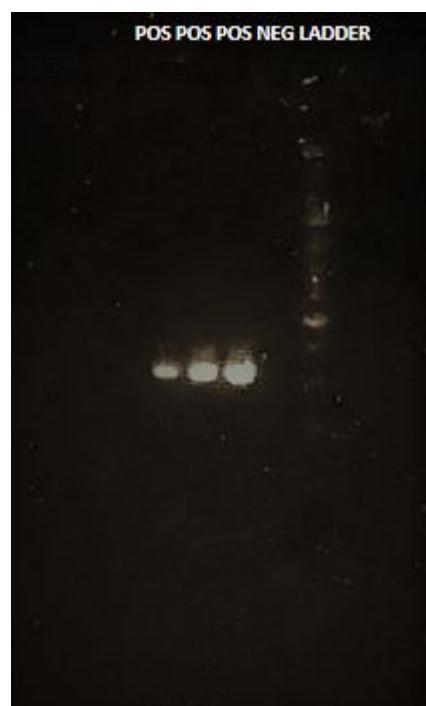
#### 4.2 Diagnóstico histológico e molecular

O exame histológico realizado nas amostras de ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, não demonstrou presença de cistos de *Sarcocystis* spp e *Neospora caninum*, sendo considerados os tecidos reprodutivos histologicamente negativos, além disso, não foram encontradas nenhuma alteração tecidual.

Nesta pesquisa, nenhuma das amostras estudadas foram positivas para *Sarcocystis* e *Neospora caninum* quando submetidas ao PCR convencional utilizando os marcadores do gene COI para *Sarcocystis* que amplifica 900 bp e o gene Nc5, para *N. caninum* que amplifica 338 bp. Somente as amostras controles positivos amplificaram demonstrando que a reação funcionou, porém o DNA de ambos os protozoários não foram detectados, como ilustrado na Figura 9 e Figura 10.



**Figura 8.** Imagem do gel de agarose 1,5 % demonstrando os controles positivos para *Sarcocystis* spp. Amostras provenientes de cistos de tecido esofágico de ovinos oriundos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Seguida de marcador de tamanho molecular de 100pb.



**Figura 9.** Imagem do gel de agarose 1,5 % demonstrando o primeiro controle positivo para *N. caninum* de amostra proveniente de cepa NC-Bahia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), segundo e terceiro controle de amostra de cultivo celular do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Seguida de marcador de tamanho molecular de 100pb.

## 5 DISCUSSÃO

Nas amostras analisadas neste estudo não foram visualizados cistos nos tecidos reprodutivos e no diagnóstico molecular também não foram detectados DNA de ambos os agentes. No estudo feito por Lúcio et al., (2020), gatos submetidos a necropsia apresentaram cistos nos cortes do músculo do vasto lateral, intercostal, subescapular e diafragma e todos os gatos histologicamente positivos também foram positivos para PCR (5/5; 100%). Um achado que surpreendeu os autores foi que todos os casos histologicamente negativos também eram PCR negativos, assim como os resultados encontrados nesta pesquisa. Os autores esperavam que alguns músculos histologicamente negativos pudessem apresentar resultados de PCR positivos, o que não aconteceu. Por se tratar de animais necropsiados haveria a possibilidade de analisar também os órgãos reprodutivos, diferente da nossa pesquisa que não são órgãos oriundos de necropsia e sim de esterilização, fato que limitou nosso estudo.

Cistos de *Sarcocystis* spp. normalmente são encontrados em regiões consideradas como órgãos-alvos como: língua, esôfago, coração, diafragma e músculo esquelético, com isso a maioria dos estudos realizados visam pesquisar a ocorrência de sarcocistos nesses tecidos, porém estes só podem ser analisados quando o animal foi a óbito, em situações em que a necropsia é feita ou em abatedouros, em se tratando de animais de produção como grandes e pequenos ruminantes.

Gareh et al., (2020) pesquisaram a ocorrência de *Sarcocystis* em amostras de testículos de camelos abatidos, e também não encontraram cistos, no entanto outros órgãos foram acometidos como esôfago que foi o órgão mais acometido (49%), seguido pelo diafragma (26%) e músculo cardíaco (17%). A taxa de infecção foi de 81,4% (57 de 70) em machos e 60% (18 de 30) em fêmeas. Diferente do nosso estudo, não foi possível pesquisar se outros órgãos foram parasitados, pois os animais inseridos na pesquisa foram procedentes de cirurgias de castração realizadas na ilha.

Bucca et al., (2011) examinaram amostras de diversos tecidos de bovinos para avaliar e comparar a taxa de infecção por *Sarcocystis* em músculos alvo (o coração, a língua, o esôfago e o diafragma) e não-alvo, 32% (16 /50) no músculo cremaster. Segundo os autores, todos os sarcocistos observados tinham uma parede muito fina (<2 mm) sem estrias evidentes e com base nessa morfologia, concluíram que provavelmente tratava-se de *S. cruzi*.

Observa-se que cistos teciduais de ambos os protozoários possuem predileção por órgãos-alvos, mas também podem apresentar-se em outros órgãos em menor frequência. Embora, nosso estudo não tenha encontrado cistos nos tecidos reprodutivos, não se pode descartar que esses animais poderiam abrigar cistos em outras regiões.

Lúcio et al., (2020) observaram múltiplos sarcocistos no músculo esquelético de um gato doméstico (*Felis catus*) do sul do Brasil e foram observados múltiplas estruturas basofilicas ovais a alongadas de tamanhos variados são observadas dentro das fibras musculares, mas nenhuma reação inflamatória ou degeneração foi observada, mesmo nos casos de múltiplos sarcocistos. Para Gareh et al., (2020) aparente falta de resposta inflamatória pode ser atribuída ao fato de que os protozoários estão localizados em cistos dentro das fibras musculares, que oferecem proteção contra a imunidade do hospedeiro.

Um fator importante que vale destacar como possibilidade do resultado negativo obtido é a faixa etária e o número de amostras. Em nosso trabalho apenas filhotes e adultos foram observados. Gatos mais velhos teriam mais chances de apresentarem cistos teciduais tendo em vista o tempo maior de exposição que gatos mais jovens. Por outro lado, o número de amostras pode não ter sido representativo e com um número maior aumentaria também as chances de encontrar os sarcocistos, principalmente no caso dos machos, como em outros trabalhos que encontraram no músculo cremaster.

Segundo Reche-Júnior et al., (2022), pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção por *N. caninum* em gatos. Embora os anticorpos para *N. caninum* tenham sido detectados por Dubey et al., (2002) em gatos domésticos naturalmente expostos. Lima et al., (2018) demonstraram que os gatos selvagens estão expostos à infecção por *N. caninum* na ilha de Fernando de Noronha, em baixa frequência. Segundo Nazari et al., (2023) alguns animais parecem ser naturalmente resistentes à infecção por *N. caninum*, enquanto outros são muito suscetíveis. A possível explicação para esta variação pode ser devido ao tipo de hospedeiro, sua herança genética e, claro, seu estado imunológico.

Com base nos resultados obtidos por Nazari et al., (2023), em sua pesquisa, felídeos selvagens e gatos domésticos podem atuar como potenciais hospedeiros de *N. caninum* apesar do fato de que a fonte do parasito para esses animais e as vias de sua transmissão para outros animais não é bem reconhecida, pois os estudos feitos com gatos se limitam a análise somente a análises sorológicas.

A infecção por *N. caninum* foi mais frequente entre os felinos selvagens em comparação com os gatos domésticos (26% vs. 11%,  $P = 0,03$ ), o que pode ser devido à extensa exposição a oocistos de *N. caninum* contidos em pastagens por hospedeiros definitivos e fatores climáticos do ambiente de vida, como sol, chuva, umidade e temperatura. Além disso, manter o status de gatos não domésticos, ou seja, cativos ou soltos, provavelmente está associado à forma como são alimentados e como são infectados (NAZARI et al., 2023).

Para Nazari et al., (2023) não foram encontradas diferenças significativas entre o gênero e a taxa de soropositividade do *Neospora* ( $P = 0,75$ ), embora a prevalência tenha sido maior em machos (16%; IC 95% 8–25%) do que em fêmeas (14%; IC 95% 4–24%) gatos domésticos. Os autores reforçam que isso pode estar relacionado aos hábitos alimentares e que a chance de estarem expostos aos oocistos do parasito, são as mesmas para ambos os sexos.

Karimi et al., (2023) concluíram que a PCR é mais sensível do que as técnicas histopatológicas para o diagnóstico da infecção por *N. caninum*, pois em camelos estudados, não houve lesões macroscópicas visíveis nos tecidos, e o exame microscópico das amostras de cérebro, fígado e linfonodos não mostrou alterações histopatológicas consistentes com infecção por *N. caninum*. No entanto, um camelo foi positivo para PCR. Nessa perspectiva esperava-se encontrar gatos positivos no diagnóstico molecular.

Mesquita et al., (2018) relataram lesões em placenta de cabras naturalmente infectadas por *Neospora caninum*. As lesões foram classificadas principalmente por necrose envolvendo o mesênquima das vilosidades coriônicas e células trofoblásticas, geralmente associadas a infiltrado inflamatório mononuclear e em alguns casos de infiltrados neutrofílicos. Também visualizaram áreas necróticas caracterizadas por perda da arquitetura tecidual, eosinofilia, restos celulares associados com raros focos de calcificação, picnose nuclear e leve infiltrado neutrofílico. Placentite multifocal foi observada no interstício abaixo do epitélio coriônico e frequentemente ao redor dos vasos, e era composta principalmente por plasmócitos, linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos.

Al-Shaeli et al., (2022) também mencionaram ter encontrado alterações nas placenta examinadas. Foram visualizados uma estrutura tecidual semelhante a cisto, focos necróticos e infiltração de células mononucleares. Outras lesões foram espessamento da placa coriônica na placenta, vacuolização grave e morte de neurônios, microgliose, desmielinização, edema e proliferação de astrócitos no cérebro. Além disso, deposição fibrosa e gordurosa com estenose no coração, necrose parenquimatosa, atrofia acentuada, vacuolização e hialinização de hepatócitos, megacariócitos. Ao contrário do nosso estudo que não identificou a presença do protozoário e nenhuma alteração microscópica nas placenta analisadas.

De acordo com Pereira et al., (2020) na literatura há uma escassez de trabalhos no Brasil sobre gatos ferais, seus impactos causados aos demais animais, as enfermidades que podem ser transmitidas e seu comportamento. Ao contrário da Ilha Furtada que não é habitada, Fernando

de Noronha é uma ilha oceânica brasileira habitada, localizada em um arquipélago, que sofre com o mesmo problema da ilha fluminense. Um dos maiores desafios para a conservação do arquipélago é a presença de espécies invasoras (EI), como o gato (*Felis catus*). Espécies invasoras são responsáveis pela extinção de diversas espécies em ambientes insulares, principalmente devido à predação de espécies endêmicas e ameaçadas (FONSECA et al., 2021).

Os gatos ferais são passíveis de transmitir doenças não somente à fauna silvestre brasileira, mas aos demais animais domésticos e humanos. Dentre os estudos científicos sobre esses animais no Brasil, a categoria Doenças/Zoonoses foi a que mais trouxe resultados, sendo estes estudos considerados recentes. Dentre as zoonoses mais estudadas, a que mais se destacou foi a Toxoplasmose. Mesmo assim, são poucos os estudos que tratam desta problemática, bem como de alternativas de prevenção (PEREIRA et al., 2020). Portanto, é válido que outras coccidioses como sarcocistose e neosporose sejam investigadas em gatos, além disso, vale ressaltar que não há estudos no estado do Rio de Janeiro sobre a ocorrência de ambos os protozoários nessa espécie.

Para Ferreira et al., (2014) devem ser desenvolvidas campanhas educativas dirigidas à população humana local que enfatizem a importância da posse responsável de animais de estimação, tais como a esterilização de gatos domésticos e selvagens para evitar o crescimento descontrolado da população de animais domésticos na região; vacinação e cuidados de saúde felinos; as consequências do abandono desses animais em áreas naturais e o impacto do manejo inadequado do lixo produzido pelo município. Essas campanhas educativas devem estar vinculadas às campanhas de esterilização, vacinação e desparasitação que são oferecidas à população local por meio de parcerias entre poderes públicos, institutos de pesquisa, ONGs que atuam na área e faculdades de Medicina Veterinária da região.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa realizada com amostras de tecidos reprodutivos, pode-se concluir que:

- A população de gatos incluídas neste estudo não apresenta os protozoários *Sarcocystis* spp e *Neospora caninum* em seus órgãos reprodutivos como: testículos, ovários e úteros.
- É possível evidenciar que *Sarcocystis* e *Neospora caninum* não demonstra predileção por órgãos reprodutivos e desse modo não costuma parasitar esses tecidos, tendo em vista que não foi encontrado em nenhuma amostra pesquisada através do diagnóstico histopatológico e molecular.
- São necessários mais estudos para contribuir com dados epidemiológicos sobre a ocorrência de *Sarcocystis* spp e *N. caninum* em gatos e seu impacto ambiental, tendo em vista que estudos demonstram que ambos os protozoários acometem a espécie felina.
- É de extrema importância que os gatos asselvajados da Ilha Furtada continuem sendo estudados para a investigação de diversas doenças e é indispensável que sejam tomadas medidas socioeducativas e jurídicas para conter o abandono desses animais e consequentemente a implantação de um controle reprodutivo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUBAKAR, S.; TEOH, B.; SAM, S.; CHANG, L.; JOHARI, J.; HOOI, P.; LAKHBEER-SINGH, H.; ITALIANO, C. M.; OMAR, S. F. S.; WONG, K.; RAMLI, N.; TAN, C. Outbreak of human infection with *Sarcocystis nesbitti*, Malaysia, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 1989 - 1991, 2013.
- ALMERÍA, S.; SERRANO-PÉREZ, B.; LÓPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p.177-182, 2017.
- AL-SHAELI, S. J. J.; ETHAEB, A. M.; GHARBAN , H. A. J. Molecular and histopathological identification of ovine neosporosis (*Neospora caninum*) in aborted ewes in Iraq. **Veterinary World**, v. 13, n. 3, p.597–603, 2020.
- ALVES. M. E. M.; FERNANDES, F. D.; BRÄUNIG, P; MURER, L.; MINUZZI, C.E; SANTOS, H. F; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F.S. F. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. in species of naturally infected birds. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 42, p.1-6, 2022.
- ALVES, M. E. M.; CADORE. G. C.; OLIVEIRA, C. S; PORTELLA, L. P.; SANGIONI, L. A.; VOGEL. F. S. F. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in samples of meat. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.38, n.3, p. 425-429, 2018.
- ANTONELLO, A. M.; PIVOTO, F. L.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; POMPERMAYER, E.; VENTURINI, M. C.; VOGEL, F. S. F. Investigação de anticorpos contra *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis cruzi* em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.5, p.1465-1468, 2015.
- ARRAES-SANTOS, A. I.; ARAÚJO, A. C.; MAÍRA F. GUIMARÃES, M.; SANTOS, J. R.; PENA, H.F. J.; GENNARI, S. M.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in domestic mammals from two distinct regions in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Veterinay Parasitology Regional Studies and Reports**, 5, p. 14-18, 2016.
- BARROS, L. D.; MIURAA, A. C; MINUTTIA, A. F.; VIDOTTOA, O.; GARCIA, J. L. *Neospora caninum* in birds: a review. **Parasitology International**, v. 67, n.4, p. 397-402, 2018.
- BERNÁ, L.; MARQUEZ, P.; CABRERA, A.; GREIF, G.; FRANCIA, M. E.; ROBELLO, C. Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals isassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. **Genome Research**, v. 31, p. 823-833, 2022.
- BERNARDINO, P. N.; SMITH, W. A.; CONRAD, P. A.; PACKHAM, A. E.; TAMEZ-TREVINO, E.; BARNUM, S.; PUSTERLA, N. Molecular detection of *Sarcocystis neurona* in cerebrospinal fluid from 210 horses with suspected neurologic disease. **Veterinary Parasitology**, v. 29, p. 1-6, 2021.
- BISBY, T. M.; HOLMAN, P. J.; PITOC, G. A.; PACKER, R. A.; THOMPSON, C. A.; RASKIN, R. E. *Sarcocystis* sp. encephalomyelitis in a cat. **Veterinary Clinical Pathology**, v.

39, n.1, p. 105-112, 2010.

BJERKAS, L.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.70, p. 271-274, 1984.

BRAGA, M. S. C. O.; ANDRÉ, M. R.; JUSI, M. M. G.; FRESCHE, C. R.; TEIXEIRA, M. C. A.; MACHADO, R. Z. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 107-111, 2012.

BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H.V.; AMARANTE, A. F. T. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, p. 281-285, 2007.

BRILHANTE, A. B. C; BELOTI, L. J.; BONUTI, M. R. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e cães da microrregião de Fernandópolis, estado de São Paulo, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022.

BUCCA, M.; BRIANTI, E.; GIUFFRIDA, A.; ZINO, G.; CICCIARI, S.; PANEBIANCO. 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.

CABRAL. L. D. R. **Transmissão Vertical de *Toxoplasma gondii*, *Neospora* spp. e *Sarcocystis neurona* em éguas da raça puro sangue inglês (PSI)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, 2020.

CAÑÓN-FRANCO, W. A., LÓPEZ-OROZCO, N., CHRISTOFF, A. U., CASTILHO, C. S.; ARAÚJO, F. A. P.; VERMA, S. K.; DUBEY, J. P.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Molecular and morphologic characterization of *Sarcocystis felis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in south american wild felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 217, p. 15-20, 2016.

CASTEL, A; OLBY, N. J; BREITSCHWERDT, E. B.; THOMASC, B; MAGGIC, R. G.; SHELTON, G. D. Co-infection with *Bartonella henselae* and *Sarcocystis* sp. in a 6-year-old male neutered domestic longhair cat with progressive multifocal neurological signs **Veterinary Quarterly**, v. 39, n.1, p. 168-173, 2019.

CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. All about neosporosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 26, n.3, p.253-279, 2017.

CHAUHAN, R. P.; KUMARI, A.; NEHRA, A.K.; RAM, H.; GARG, R.; BANERJEE, P. S.; KARIKALAN, M.; SHARMA, A. K. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Sarcocystis suisominis* infecting domestic pigs (*Sus scrofa*) in India. **Parasitology Research**, v. 119, p. 3347-3357, 2020.

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A. F. T.; APOLINÁRIO, J. C.; COELHO, N. M. D.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; BRESCIANI, K. D. S. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil.

**Parasitology Research**, v. 109, p. 1009-1013, 2011.

COSTA, L. S.; PENA, H. F. J.; WITHOEFT, J. A.; CRISTO, T. G.; MELO, I. C.; OLIVEIRA, S.; MOURA, A. B.; CASAGRANDE, R. A. Abortamento por *Neospora caninum* em bovinos de leite no sul de Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, n. 1, p. 1-7, 2021.

CUNHA, C. L. G. A. **Investigação de anticorpos para *Neospora caninum* em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 2013.

DIAS, L. R. O.; FERRAZ, H. T.; VIU, M. A. O.; LOPES, D. T.; VIU, A. F. M. Doenças parasitárias reprodutivas em bovinos - Neosporose. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 8, n. 3, p.1-20, 2014.

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

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.2, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 39, p. 1009-1034, 2009.

DUBEY J. P.; SCHARES G.; ORTEGA-MORA L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323-67, 2007.

DUBEY, J. P.; BENSON, J.; LARSON, M. A. Clinical *Sarcocystis neurona* encephalomyelitis in a domestic cat following routine surgery. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 261-267. 2003.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; HILL, D.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O. C. H. J. C. R.; SILVA, J. C.; OLIVEIRA-CAMARGO, M. C.; GENNARI, S. M. Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1251-1252, 2002.

DUBEY, J. P.; CARPINTEIRO, J. L.; SPEER, C. A.; TOPO, M, J.; UGGLA, U. M. Doença protozoária fatal recém-reconhecida em cães, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 129, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY J. P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 10, p. 1061-1078, 1976.

ELSHEIKHA, H. M.; KENNEDY, F. A.; MURPHY, A. J.; SOLIMAN, M.; MANSFIELD, L. S. Sarcocystosis of *Sarcocystis felis* in cats. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 36, n. 3, 2006.

ESPINDOLA, B. D.; FERNANDES, F. D.; ROMAN, I. J.; SAMOEL, G. V. A.; BARCELOS, R. A. D.; DÖHLER, A. R.; BOTTON, S. A.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. Detection of *Sarcocystis* spp. and *Toxoplasma gondii* in swine and detection of DNA of these protozoa in

tissues and sausages. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 31, n. 3, p.1-6, 2022.

FANTINI, P.; SAMPAIO, I. S.; SILVA, M. O. Mieloencefalite protozoária equina: relato de caso. **Ars veterinária**, v. 37, n. 4, p. 242-246, 2021.

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

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

FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L.R.; DANTAS, E. S.; SOUTO, D. V. O.; PENA, H. F. J.; ATHAYDE, A. C. R.; AZEVÊDO, S. S. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in domestic cats from the Brazilian semi-arid: seroprevalence and risk factors. **Veterinary Medicine**, v. 66, n. 4, p. 1060-1066, 2014.

FERNANDES, F. D.; BRÄUNIG, P.; LÚCIO, B. M.; FLORES, M. M.; ANDRADE, C. M.; VOGEL, F. S. F. Detection of anti-*Sarcocystis* spp. antibodies in domestic cats, in southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 122, n. 3, p. 877-879, 2023.

FERRAZ, A.; PIRES, B. S.; BARWALDT, E; T.; SANTOS, E. M.; DALLMANN, P.R. J.; CASTRO, T. A.; NOBRE, M.O.; NIZOLI, L. Q. Presença de *Sarcocystis cruzi* em amostra fecal de cão, relato de caso. **Scire Salutis**, v. 10, n.1, p. 14-17, 2020.

FERREIRA, M. S. T.; FERREIRA, M. S. T; FERNANDES, F. D; ALVES, M. E. M; BRÄUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Performance of the dot-blot test method for detecting antibodies to *Sarcocystis* spp. in cattle. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 5, p. 385-388, 2020.

FERREIRA, M. S. T. **Diagnóstico laboratorial de *Sarcocystis* spp. em bovinos**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2018.

FERREIRA, G. A.; NAKANO-OLIVEIRA, E.; GENARO, G. Domestic cat predation on neotropical species in an insular atlantic forest remnant in southeastern Brazil, **Wildlife Biology**, v. 20, p. 167-175, 2014.

FONSECA, F. S.; MANGINI, P. R.; MELLO, T. J.; ARAÚJO, R.; SILVA, J. C. R.; MICHELETTI, T. Feral cat population rises on Fernando de Noronha archipelago: wildlife needs different cat control approaches, and needs it now. **Biodiversidade Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 1-9, 2021.

FRENKE, J. K.; RUIZ, A. Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by Cats. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 133, n. 4, p. 409-418, 1976.

GAREH, A.; SOLIMAN, M.; SALEH, A. A.; EL-GOHARY, F. A.; EL-SHERBINY, H. M. M.; MOHAMED, R. H.; ELMAHALLAWY, E. K. Epidemiological and histopathological investigation of *Sarcocystis* spp. in slaughtered dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt. **Veterinary Science**, v. 7, n.162, p.1-10, 2020.

GENNARI, S. M.; FERREIRA, J. I. G. S.; PENA, H. F. J.; LABRUNA, M. B.; AZEVEDO, S. S. Frequency of gastrointestinal parasites in cats seen at the University of São Paulo Veterinary Hospital, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 423-428, 2016.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Occurrence of protozoa and helminths in faecal samples of dogs and cats from São Paulo city. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.36, n.2, p.97-91, 1999.

GHAREKHANI, J.; YAKHCHALI, M.; BERAHMAT, R. *Neospora caninum* infection in Iran (2004–2020): A review. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 4, p. 671-686, 2020.

GILLIS, K. D.; MACKAY, R. J.; YOWELL, C. A.; LEVY, J. K.; GREINER, E. C.; DAME, J. B.; CHEADLE, M.A.; HERNANDEZ, J.; MASSEY, E. T. Naturally occurring *Sarcocystis* infection in domestic cats (*Felis catus*). **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 877-883, 2003.

GJERDE, B.; LA FUENTE, C.; ALUNDA, J. M e LUZÓN, M. Molecular characterisation of five *Sarcocystis* species in domestic sheep (*Ovis aries*) from Spain. **Parasitology Research**, v. 119, p. 215-231, 2020.

GOMES, M. A R. B; SPILLER, P. R ; PAIVA, F. W. F.; RIBEIRO, T. M. P. Hemoparasitas e Detecção de Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães e gatos no estado de Roraima. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 13, n. 4, p. 461- 469, 2019.

GONÇALVES, S.P.; ARAGÃO, K, C, G.; TAKEDA, G. K. F. Pesquisa de sarcocistos de *Sarcocystis* spp na musculatura bovina. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 39-49, 2016.

GONDIM, L. F. P.; SOARES, R. M.; MORÉ, G.; JESUS, R. F.; LLANO, H. A. B. *Sarcocystis neurona* and related *Sarcocystis* spp. shed by opossums (*Didelphis* spp.) in south America. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 30, n.3, p. 1-22, 2021.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

HAMMERSCHMITT, M. E.; HENKER, L. C.; LICHTLER, J.; COSTA, F. V. A.; SOARES, R. M.; LLANO, H. A. B.; PAVARINI, S. P. P. First molecular characterization of *Sarcocystis neurona* causing meningoencephalitis in a domestic cat in Brazil, **Parasitology Research**, v. 119, p. 675-682, 2020.

HAY, A. N.; WITONSKY, S. G.; LINDSAY; D. S.; LEROITH, T.; ZHU, J.; KASMARK, L.; LEETH, C. M. *Sarcocystis neurona* induced myeloencephalitis relapse following anticoccidial treatment. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 371-378, 2019.

HECKER, Y. P.; BURUCÚA, M. M.; FIORANI, F.; RIVERA, J. E. M.; CIRONE, K. M.; DORSCH, M. A.; CHEUQUEPÁN, F. A.; CAMPERO, L.; CANTÓN, G. J.; MARÍN, M. S.; ORTEGA-MORA, L. M.; MOORE, D. P. Reactivation and foetal infection in pregnant heifers infected with *Neospora caninum* live tachyzoites at prepubertal age. **Vaccines**, v. 10, n. 1175, p. 1-17, 2022.

HUERTAS-LÓPEZ, A.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ , R.; DIEZMA-DÍAZ, C.; ÁLVAREZ-  
36

GARCÍA, G.; MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep's full-cream milk by a time-resolved fluorescence immunoassay. **Veterinary Parasitology**, v. 301, p. 1-9, 2022.

IRIE, T.; URAGUCHI, K.; ITO, T.; YAMAZAKI, A.; TAKAI, S.; YAGIA, K. First report of *Sarcocystis pilosa* sporocysts in feces from red fox, *Vulpes vulpes schrenckii*, in Hokkaido, Japan. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 11, p. 29-31, 2020.

JANUSKEVICIUS, V.; JANUSKEVICIENE, G.; PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; PETKEVICIUS, S. Prevalence and intensity of *Sarcocystis* spp. infection in animals slaughtered for food in Lithuania, **Veterinary Medicine**, v. 64, n. 4, p. 149-157, 2019.

JAPA, O., NUANGMEK, A., PRAKHAMMIN, K. e FLYNN, R. J. Prevalence of vertically transmitted *Neospora caninum* amongst beef cattle in Phayao, Thailand. **Parasitology International**, v. 70, p. 98-101, 2019.

JUOZAITYTE-NGUGU, E.; ŠVAŽAS, S.; ŠNEIDERIS, D.; E-LUKOŠIENE, E. R.; BUTKAUSKAS, D.; PRAKAS, P. The role of birds of the family corvidae in transmitting *Sarcocystis* protozoan parasites. **Animals**, v. 11, n. 3258. p.1-11, 2021.

KARIMI, S.; BAHARI, A.; NOURIAN, A.; AZAMI, S.; NAMAVARI, M.; BASSO, W.; SAZMAND, A.; HEMPHILL, A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in one-humped camels (*Camelus dromedarius*) in central desert of Iran. **Parasitology Research**, v. 1, n. 22, p. 847-852, 2023.

KLEIN, C.; BARUA, S.; LICCIOLI, S.; MASSOLO, A. *Neospora caninum* DNA in coyote fecal samples collected in a urban environment. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 55, n. 1, p.1-4, 2019.

KOCH, M. O.; LASKOSKI, L. M.; AGUIAR, D. M.; SILVA, B. R.; RÉGIO, R. R.; ISHIKURA, J. I.; VAZ, F. F.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in horses, dogs and cats from Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 56, n.2, p. 1-8, 2019.

LABRUNA, M. B.; PENA, H. F. J.; SOUZA, S. L. P.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; RAGOZO, A. M. A.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p. 183-193, 2006.

LATIF, B.; VELLAYAN, S.; OMAR, E.; ABDULLAH, S.; DESA N. M. Sarcocystosis among wild captive and zoo animals in Malaysia. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 48, n. 3, p. 213-217, 2010.

LEFKADITIS, M.; MPAIRAMOGLOU, R.; SOSSIDOU, A.; SPANOUDIS, M.; TSAKIROGLOU, M. *Neospora caninum*, A potential cause of reproductive failure in dairy cows from Northern Greece. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.19. p. 1-5, 2020.

LIMA, D. C. V.; MAGALHÃES, F. J. R.; ANDRADE, M. R.; SILVA, J. G.; MORAIS, E. G. F.; LIMA FILHO, C. D. F.; PORTO, W. J. N.; MOTA, R. A. Anti-*Neospora caninum* antibodies in feral cats on the island of Fernando de Noronha, Brazil. **Acta Parasitologica**, v.

63, n. 3, p. 645-646, 2018.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: An Update. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, p. 205-222, 2020.

LLANO, H. A. B. **Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de diversas classes taxonômicas: relações entre *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona* e organismos correlacionados prevalentes no Brasil.** Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicada às zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2019.

LÚCIO, B. M.; MINUZZI, C. E.; AVILA, N. C.; TONDO, L. A. S.; VOGEL, F. S. F.; KOMMERS, G. D.; FERNANDES, F. D.; MARQUES, C. T.; FLORES, M. M. Natural occurring muscular *Sarcocystis* in urban domestic cats (*Felis catus*) without *Sarcocystis*-associated disease. **Acta Parasitologica**, 2020.

LÚCIO, B. M. **Infecção natural por *Sarcocystis* spp. em gatos do sul do Brasil: desenvolvimento de cistos musculares, epidemiologia e soroprevalência,** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

MAKY, M. A.; MOHAMMED, E. S. Molecular Identification of *Sarcocystis* spp. in meat and meat products in Qena, Upper Egypt, **Journal of Animal Health and Production**, v. 9, n. 1, p. 88-93, 2021.

MARUGAN-HERNANDEZ, V. *Neospora caninum* and bovine neosporosis: current vaccine **Research Journal of Comparative Pathology**, v. 157, p. 193-200, 2017.

MAZUZ, L. M.; MIMOUN, L.; SCHVARTZ, G.; TIROSH-LEVY, S.; SAVITZKI, I.; EDERY, N.; BLUM, S. E.; BANETH, G.; PUSTERLA, N.; STEINMAN, A. Detection of *Neospora caninum* infection in aborted equine fetuses in Israel. **Pathogens**, v. 9, n. 962, p. 1-11, 2020.

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

MELENDEZ, P.; ILHA, M.; WOLDEMESKEL, M.; GRAHAM, J.; COARSEY, M.; BAUGHMAN, D.; WHITTINGTON, L.; NAIKARE, H. An outbreak of *Neospora caninum* abortion in a dairy herd from the state of Georgia, United States. **Veterinary, Medicine and Science**, v. 7, p. 141-147, 2021.

MENESES, I. D. S.; ANDRADE, M. R.; UZÊDA, R. S.; BITTENCOURT, M. V.; LINDSAY, D. S.; GONDIM, L. F. P. Frequency of antibodies against *Sarcocystis neurona* and *Neospora caninum* in domestic cats in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 526-529, 2014.

MESQUITA, L. P.; COSTA, R. C.; NOGUEIRA, C. I.; ABREU, C. C.; ORLANDO, D. R.; ASCARI JUNIOR, I.; PECONICK, A. P.; VARASCHIN, M. S. Placental lesions associated with abortion and stillbirth in goats naturally infected by *Neospora caninum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 3, p. 444-449, 2018.

MINUZZI, C. E. **Detecção e caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em tecidos de**

**ovinos abatidos em frigoríficos no sul do Brasil.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

MOHD FADIL, N. F.; TENGKU-IDRIS, T. I. N.; SHAHARI, S.; FONG, M.Y.; LAU, Y. L. Molecular evidence of *Sarcocystis* species Infecting reptiles in peninsular Malaysia. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 14, n. 4, p. 623-630, 2019.

MOURA, L. R.; FRANCISCO JÚNIOR, A.; ORPINELLI, S. R. T.; FRANCISCO, M. M. S. e COELHO, H. E. *Sarcocystis neurona* associado à mieloencefalite protozoária equina em Pirenópolis-Go: relato de caso. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 139-149, 2008.

MUNHOZ, A. D.; HAGE, S. B.; CRUZ, R. D. S.; CALAZANS, A. P. F.; SILVA, F. L. ALBUQUERQUE, G. R.; LACERDA L. C. Toxoplasmosis in cats in northeastern Brazil: frequency, associated factors and coinfection with *Neospora caninum*, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus. **Veterinay Parasitology Regional Studies and Reports**, v. 8, p.35-38, 2017.

NAZARI, N.; KHODAYARI, M. T.; HAMZAVI, Y.; RAEGHI, S; KARAMATI, S. A; FALAHİ, S.; BOZORGOMID, A.; SAJEDI, M. T. Systematic review and meta-analysis of role of felids as Intermediate hosts in the life cycle of *Neospora caninum* based on Serological Data. **Acta Parasitologica**, v. 68, p. 266-276, 2023.

OCTAVIANO, J. I.; CARNEIRO, F. P.; REDOAN, M. A.; ALONSO, M. A.; FERNANDES, C. B. *Neospora* spp infectious abortion in the horse - case report. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 72, n. 4, p. 1381-1385, 2020.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S.; LARSSON, C. E.; HAGIWARA, M. K. Prevalência de endoparasitas em gatos na cidade de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 23, n.1, p. 39-46, 1986.

ONUMA, S. S. M.; MELO, A. L. T.; KANTEK, D. L. Z.; CRAWSHAW-JUNIOR, P. G.; MORATO, R. G.; MAY-JÚNIOR, J. A.; PACHECO, T. A e AGUIAR, D. M. Exposure of free-living jaguars to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in the Brazilian Pantanal. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 547-553, 2014.

PEREIRA, G. J. C.; SANTOS-PREZOTO, H. H.; DIAS, A. M. N.; OSHIO, L. T. Estudos científicos sobre gatos ferais no Brasil. **Pubvet, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.5, p.1-8, 2020.

PEREIRA, L. M.; LUCA, G.; ABICHABKI, N. L. M.; BROCCHI, J. C. V.; BARONI, L.; ABREU-FILHO, P. G.; YATSUDA, A. P. Atovaquone, chloroquine, primaquine, quinine and tetracycline: antiproliferative effects of relevant antimalarials on *Neospora caninum*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.30, n.1, p. 1-10, 2021.

PESTECHIAN, N.; YOUSEFI, H. A.; KALANTARI, R.; JAFARI, R.; KHAMESIPOUR, F.; KESHTKAR, M.; ESMAEILIFALLAH, M. Molecular and microscopic investigation of *Sarcocystis* species isolated from sheep muscles in Iran. **Journal of Food Quality**, p.1-6, 2021.

PORTELLA, L. P. FERNANDES, F. D; MINUZZI, C. E; PELEGRINI, L. F. V. SANGIONI,

L.A. CARGNELUTTI, J. F.; VOGEL, F.S.F. Detection and characterization of *Sarcocystis* infection in naturally infected buffaloes, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 3, p. 424-428, 2021.

PORTELLA, L. P.; FERNANDES, F. D.; RODRIGUES, F. S.; MINUZZI, C. E.; SANGIONI, L. A.; FLORES, M. M.; VOGEL, F. S. F. Macroscopic, histological, and molecular aspects of *Sarcocystis* spp. infection in tissues of cattle and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 1-6, 2021.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; JUOZAITYTÈ-NGUGU, E. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in the herring gull, *Larus argentatus*, from Lithuania. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 2, p. 2-6, 2020.

QUADROS, R. M.; BARBOSA, J. A.; MARQUES, S. M. T.; CÉLSO PILATI, C. Sarcocistose em bovinos abatidos em frigorífico com inspeção federal em Santa Catarina. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n.1, p. 1-5, 2019.

RAGOZO, A. M. A.; MURADIAN, V.; SILVA, J. C. R.; CARAVIERI, R.; AMAJONER, V. R.; MAGNABOSCO, C.; GENNARI, S. M. Occurrence of gastrointestinal parasites in feces of cats from the cities of São Paulo and Guarulhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 244-246, 2002.

RECHE-JÚNIOR, A.; DANIEL, A. G. T.; TADINI, B. S.; SANTANA, E.; FILGUEIRA, K. D.; GARGANO, R. G.; SELLERA, F. P.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. Serological survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in shelter-housed cats infected with feline immunodeficiency virus, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 1-6, 2022.

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

REYS, L. **Parasitologia**. 4.ed. Guanbara Koogan, Rio de Janeiro. 181- 186p. 2008.

RIBEIRO, T. M. P.; REIS, T. S.; SOUSA, S. A. P.; FREIRIA, L. M.; GOMES, F. A.; PALUDO, G. R.; SPOHR, K. A. H.; ANDRÉ, M. R.; SANTOS, H. D.; JAYME, V. S. Antibody frequency for *Toxoplasma gondii* and *Neospora* spp. in domiciliated and stray cats from Araguaína, Tocantins. Eastern **Amazonia. Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 2, p. 629-640, 2022.

ROSENTHAL, B. M. Zoonotic *Sarcocystis*, **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 151-157, 2021.

RUBIOLA, S.; CIVERA, T.; PANEBIANCO, F.; VERCELLINO, D.; CHIESA, F. Molecular detection of cattle *Sarcocystis* spp. in north-west Italy highlights their association with bovine eosinophilic myositis. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2021.

RUBIOLA, S.; FRANCESCO C.; ZANET, S.; CIVERA, T. Molecular identification of *Sarcocystis* spp. in cattle: partial sequencing of Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI). **Italian Journal of Food Safety**, v.7, p. 204-208, 2018.

SAĞLAM, K.; KELEŞ, H. Sarcocystosis in the cremaster muscle of an infertile bull, spermiosis and orchitis. **Kocatepe Veterinary Journal**, v. 9, n. 3, p. 252-254 2016.

SANTOS, L. F.; BERNARDO, J. O. Considerações acerca do tratamento da encefalomielite protozoária equina: revisão. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da Fait**, v 10, n. 1, p. 1-12, 2018.

SARRI, C.; STAMATIS, C.; SARAFIDOU, T.; GALARA, I.; GODOSOPULOS, V., KOLOVOS, M.; LIAKOU, C. TSIFTSOGLOU, S.; MAMURIS, Z. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. **Food Control**, v. 43, p. 35- 41, 2014.

SEMANGO, G.; HAMILTON, C. M.; KREPPEL, K.; KATZER, F.; KIBONA, T.; LANKESTER, F.; ALLAN, K. J.; THOMAS, K. M.; CLAXTON, J. R.; INNES, E. A.; SWAI, E. S.; BUZA, J.; CLEAVELAND, S.; GLANVILLE, W. A. The sero-epidemiology of *Neospora caninum* in cattle in northern Tanzania. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 1-11, 2019.

SERRA, C. M. B.; UCHÔA, C. M. A.; COIMBRA, R. A. Exame parasitológico de fezes de gatos (*Felis catus domesticus*) domiciliados e errantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 331-334, 2003.

SHNAWA, B. H.; SWAR, S. O. *Sarcocystosis* in meat-producing animals: an updating on the Molecular characterization. **Veterinary Pathobiology and Public Health**, p. 144-151, 2021.

SILVA, A. L. P.; LIMA, E. F.; SILVA FILHO, G. M.; FERREIRA, L. C.; CAMPOS, B. A.; BISON, I.; BRASIL, A. W. L.; PARENTONI, R. N.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R. Seroepidemiological survey of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in domestic cats (*Felis catus*) in Rolim de Moura, state of Rondônia, north Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 220, p.1-8, 2023.

SILVA, L. S.; ALMEIDA, A. R. G.; NETO, A. P.; MARTINEZ, A. C. Neosporose e sua epidemiologia: uma revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 12, n. 2, p. 145-154, 2019.

SOUSA, K. C. M.; HERRERA, H. M.; DOMINGOS, I. H.; CAMPOS, J. B. V.; SANTOS, I. M. C.; NEVES, H. H.; MACHADO R. Z.; ANDRÉ, M. R. Serological detection of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* in cats from an area endemic for leishmaniasis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 449-455, 2014.

STANEK, J. F.; STICH, R. W.; DUBEY, J. P.; REED, S. M.; NJOKU, C. J.; LINDSAY, D. S.; SCHMALL, L. M.; JOHNSON, G. K.; LAFAVE, B. M.; SAVILLE, W. J. A. Epidemiology of *Sarcocystis neurona* infections in domestic cats (*Felis domesticus*) and its association with equine protozoal myeloencephalitis (EPM) case farms and feral cats from a mobile spay and neuter clinic. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 239-249, 2003.

STELMANN, U.J.P.; AMORIM, R.M. Mieloencefalite protozoária equina. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.2, p.163-167, 2010.

SWAR, S. O.; SHNAWA, B. H. Recent advances in molecular characterization of *Sarcocystis* species in some meat producing animals: an updated review. **Asian Journal of Agriculture**

and **Biology**, v. 1, p. 1-10, 2021.

TEIXEIRA, A. C.; NOGUEIRA, L. K.; CHIODI, L. C.; PIVETA, M. R.; CARVALHO, R. J. M. P.; GOMIERO, R. L. S. e ZULPO, D. L. Mieloencefalite Equina por Protozoário (MEP): Revisão de Literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 32, p. 1679-7353, 2019.

VILELA, S. E. R.; OLIVEIRA, P. G.; MOREIRA, C. N.; SATURNINO, K, C.; OLIVEIRA VIU, M. A. O RIBEIRO. D. S. F.; RAMOS, D. G. S. Mieloencefalite protozoária equina (*Sarcocystis neurona* e *Neospora hughesi*): revisão. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária**, v. 13, n.1, p.1-11, 2019.

XU, J.; HIRAMATSU, R.; SUHAIMI, H.; KATO, T.; FUJIMOTO, A.; TOKIWA, T.; IKE, K.; PARK, E. Y. *Neospora caninum* antigens displaying virus-like particles as a bivalent vaccine candidate against neosporosis. **Vaccine**, v. 37, p. 6426-6434, 2019.

YAMAGE, M., FLECHTNER, O.; GOTTSSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific Oligonucleotide Primers for the Detection of Brain “Cyst” DNA of Experimentally Infected Nude Mice by the Polymerase Chain Reaction (PCR). **The Journal of Parasitology**, v.8, n.2, p.272-279, 1996.

YANG, J.; AI, J.; QI, T.; NI, X.; XU, Z.; GUO, L.; SUN, Y.; LI, Y.; KANG, M.; L. I, J. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in Stray cats and dogs in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, **MDPI, China Animals**, v. 12, p. 1-11, 2022.

YE, Y.; LIANG, Y.; HU, J.; HUANG, Z.; ZHANG, Y. First isolation of *Sarcocystis caninum* *Sarcocystis* from two domestic dogs (*Canis familiaris*) from China. **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3613-3618, 2018.

YUKSEK, V.; KILINC, O. O.; DEDE, S.; CETIN, S.; AYAN, A. Expression levels of some apoptotic and oxidative genes in sheep with sarcocystosis. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 73, n. 2, p. 4125-4134, 2022.

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer da CEUA



Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### SUBMISSÃO INVALIDADA

Informamos que a proposta intitulada "Detecção de *Sarcocystis* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em tecidos reprodutivos e sangue de gatos domésticos asselvajados na Ilha Furtada, Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro", protocolada sob o CEUA nº 6422250523 (ID 002533), sob a responsabilidade de **Andressa Ferreira da Silva** e equipe; **ALEX HERING REIS**; **Erica Rodrigues de Matos Silva**; **DANIEL UBIALI** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, foi avaliada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) em 19/06/2023, e considerada INVALIDADA baseada nas seguintes considerações:

PARECER CEUA: A proposta em tela tem como objetivo: identificar os protozoários *Sarcocystis* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em tecidos reprodutivos de gatos domésticos asselvajados da Ilha Furtada, Mangaratiba. O material biológico que será empregado será oriundo do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O docente Daniel Guimarães Ubiali declara que a origem do material (160 amostras) de tecido reprodutivo pertence ao banco de dados do laboratório (Setor de Anatomia Patológica) registro número 38073-38126 (declaração anexada ao protocolo). Segundo o docente o material estaria conservado por congelação. A proposta diz que a origem deste material é de felinos oriundos da Ilha Furtada, conhecida popularmente como Ilha dos Gatos, localizada no município de Mangaratiba, Costa Verde do Estado do Rio de Janeiro. Passo a conclusão do parecer. Por se tratar de análise de amostras mantidas em banco de dados de material biológico do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, assim não se tratando de proposta que envolva o uso de animais vertebrados e vivos, entendo que está fora do escopo da legislação pertinente a esta CEUA. Portanto encaminho parecer pela invalidação da proposta. Entretanto ressalto ao proponente a necessidade de manter em sua posse documentos que comprovem a origem do material biológico. Não se atendo somente a declaração do Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ, mas também de como este material foi obtido de felinos da referida localidade. Cabe ressaltar que a proposta não possui necessidade de aprovação na CEUA.

do Rio de Janeiro  
Seropédica, 19 de junho de 2023

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



## ANEXO B – Autorização para uso do material de diagnóstico estocado



**Memorando SAP 4/2023**

**Seropédica, RJ, 3 de abril de 2023**

### **Autorização para uso do material de diagnóstico estocado**

Eu Daniel Guimarães Ubiali, professor do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, declaro que 160 amostras de tecidos reprodutivos (fixadas em formol e/ou congeladas) asselvajados na Ilha Furtada, Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro (registro números 38073-38126) foram encaminhadas para diagnóstico histológico e serão cedidas para diagnóstico molecular, de *Sarcocystis* spp., e *Neospora caninum* e sorológico de *Toxoplasma gondii*. Os resultados serão utilizados para o projeto de mestrado intitulado "Detecção de *Sarcocystis* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em tecidos reprodutivos e sangue de gatos domésticos asselvajados na Ilha Furtada, Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro" dos alunos Erica Rodrigues de Matos Silva e Alex Hering Reis do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), sob a orientação da Professora Dra. Andressa Ferreira da Silva.

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Daniel Ubiali". Below the signature is a small rectangular box containing the following text:

Prof. Daniel Guimarães Ubiali  
Setor de Anatomia Patológica - UFRRJ  
SAP #370118 - CRMEV-RJ 17021

**Prof. Dr. Daniel Guimarães Ubiali  
Setor de Anatomia Patológica - SAP/UFRRJ**