



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JOÃO PEDRO SASSE

***NEOSPORA CANINUM* EM FRANGOS (*GALLUS GALLUS*  
*DOMESTICUS*) DE VIDA LIVRE ORIUNDOS DO NORTE DO  
PARANÁ**

JOÃO PEDRO SASSE

***NEOSPORA CANINUM* EM FRANGOS (*GALLUS GALLUS*  
*DOMESTICUS*) DE VIDA LIVRE ORIUNDOS DO NORTE DO  
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina  
2019

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA OBRA ELABORADA PELO AUTOR, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE  
GERAÇÃO AUTOMÁTICA DO SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UEL

Sasse, João Pedro.

*Neospora caninum* em frangos (*Gallus gallus domesticus*) de vida livre oriundos do Norte do Paraná / João Pedro Sasse. - Londrina, 2019. 42 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019. Inclui bibliografia.

1. *Neospora caninum* - Tese. 2. RIFI - Tese. 3. ELISA - Tese. 4. PCR - Tese.  
I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.  
CDU

JOÃO PEDRO SASSE

***NEOSPORA CANINUM* EM FRANGOS (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*) DE VIDA LIVRE ORIUNDOS DO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros  
Centro Universitário das Faculdades Integradas de  
Ourinhos – UNIFIO

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liza Ogawa  
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP

Londrina, 20 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida por ter me proporcionado chegar aonde cheguei.

Agradeço ao meu orientador não só pela constante orientação desde a graduação como aluno de Iniciação Científica, na residência e agora no Mestrado, mas também pela amizade. Sou muito grato por cada ensinamento, por cada nova oportunidade de aprendizado e pelos puxões de orelha para corrigir alguns deslizes cometidos.

Agradeço aos meus pais, Pedro e Fatima pelo incentivo em fazer o curso de Medicina Veterinária e juntamente com eles a minha noiva Bruna pelo incentivo em fazer a Pós-graduação, desde a residência e o mestrado.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, que foram companheiros, amigos e conselheiros no decorrer da produção deste trabalho.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Protozoologia Veterinária pelo companheirismo, amizade e dicas dadas para a produção deste trabalho.

Agradeço aos demais professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva que ajudaram com seus ensinamentos e conselhos no decorrer de toda a Pós-graduação.

Agradeço ao programa Ciência Animal e ao CNPq pela concessão de bolsa para que conseguisse completar esta etapa de aprendizado que foi o mestrado.

1 Sasse, João Pedro. ***Neospora caninum* em frangos (*Gallus gallus domesticus*)**  
2 **de vida livre oriundos do Norte do Estado do Paraná**. 2019. 41 páginas.  
3 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina,  
4 Londrina, 2019.

5

6

## RESUMO

7

8 *Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório de distribuição mundial,  
9 pertencente ao Filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae, Sub-Família  
10 Toxoplasmatinae. Os hospedeiros definitivos do *N. caninum*, conhecidos até o  
11 momento, são cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), coiote (*Canis latrans*), dingo  
12 australiano (*Canis lupus dingo*) e o lobo cinzento (*Canis lupus*), no entanto, esse  
13 parasita é capaz de infectar um amplo número de animais domésticos e selvagens,  
14 incluindo algumas espécies de aves. Estas são consideradas importantes fontes de  
15 avaliação da contaminação ambiental devido à ampla exposição aos agentes  
16 biológicos e químicos, podendo se infectar por meio da ingestão de oocistos  
17 esporulados do *N. caninum* presentes no ambiente. Entretanto, o real papel das  
18 aves no ciclo biológico do *N. caninum* ainda é incerto. Este trabalho teve como  
19 objetivos avaliar a prevalência de anticorpos e detectar molecularmente *N. caninum*  
20 em frangos de criações do norte do Paraná. Foram realizados testes de RIFI e  
21 ELISA para a pesquisa de anticorpos e a reação de PCR para detecção de DNA do  
22 parasita nos *pool* tecidos (cérebro, fígado, pulmão e coração) destas aves. Foram  
23 testados 366 frangos caipira de 25 propriedades e destes 65 (17,8%) e 163 (44,6%)  
24 foram positivas para o teste de RIFI e ELISA, respectivamente. Dos positivos na RIFI  
25 foram testados cérebro, pool de órgãos e nenhuma amostra se apresentou positiva.  
26 Os frangos apresentaram uma prevalência de anticorpos relativamente alta, porém  
27 não se apresentam como bons animais para manterem o parasita ou possível fonte  
28 de infecção para demais animais carnívoros, e nos testes sorológicos a RIFI se  
29 apresentou como uma técnica mais sensível para a detectar anticorpos do parasita.

30

31

32 **Palavras-chave:** Frango Caipira. RIFI. ELISA. PCR.

1 Sasse, João Pedro. ***Neospora caninum* in free range chickens (*Gallus gallus***  
2 ***domesticus*) from the north of Paraná.** 2019. 39 pages. Dissertation (Master's  
3 Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

4  
5 **ABSTRACT**

6  
7 *Neospora caninum* is an obligate intracellular parasite with world wide distribution to  
8 the phylum Apicomplexa, Family Sarcocystidae, sub-family Toxoplasmatidae. The  
9 definitive hosts of *N. caninum*, know now are the dogs (*Canis lupus familiares*),  
10 coyote (*Canis latrans*), australian dingoes (*Canis lupus dingo*) and the gray Wolf  
11 (*Canis lupus*), however, this parasite is able to infect many domestics animals and  
12 wilds, some espécies of birds. These are important sources of evaluation of  
13 envirommental contamination due to extensive exposure to the biological and  
14 chemical agente, being able to infected with ingestion of sporulated oocysts present  
15 in the enviromment. However, the real role of birds in the biological cycles it is still  
16 uncertain. This study has objective to evaluated of prevalence and molecularly  
17 detected *N. caninum* in free range chickens of farms from the north of Paraná. Were  
18 realized tests IFA and ELISA for to search antibodies and the PCR assay for  
19 detection to DNA in the pool of tissues (brain, liver, lung and heart) this free range  
20 chickens. Were 366 free range chickens tested from 25 farms and of these 65  
21 (17,8%) and 163 (44,6%) were positives in the IFA and ELISA, respectively. Of the  
22 positives in the IFA were tested brain and pool of tissues and no samples was  
23 positive. The free range chickens presence the prevalence of antibodies relatively  
24 high, however not showed godd animals for parasite maintenance or possible source  
25 of infection for other carnivorous animals, and the sorological tests the IFA presented  
26 as a effective technique for parasite detect.

27  
28  
29 **Key words:** Free range chicken. IFA. ELISA. PCR.

30  
31

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** – Formas parasitárias do *Neospora caninum*. A) Cisto tecidual com bradizoítos no interior. B) Taquizoítos corados com Giemsa. C) Oocisto esporulado. Fonte: Adaptado de Lindsay; Upton; Dubey, 1999; Dubey et al., 2004; Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007 .....14
- Figura 2** – Ciclo Biológico do *Neospora caninum*. Fonte: Adaptado de Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007 .....15
- ### ARTIGO
- Figura 1** – Mapa com a localização das propriedades onde foram coletados frangos do presente estudo.....39



## LISTA DE TABELAS

### Referencial teórico

<b>Tabela 1 -</b>	Estudos desenvolvidos no Brasil com frangos de criação livre e confinados .....	16
-------------------	---	----

### ARTIGO

<b>Tabela 1 –</b>	Comparação de resultados entre os testes de RIFI e ELISA, sendo a RIFI teste padrão ouro para diagnóstico de <i>Neospora caninum</i> em frangos caipiras .....	40
<b>Tabela 2 -</b>	Tabela com o título dos animais positivos no teste da RIFI, quantidade de animais e suas porcentagens em cada título .....	41
<b>Tabela 3 -</b>	Tabela das propriedades contendo a quantidade de animais coletados em cada propriedade, os positivos e porcentagem de positivos em cada propriedade utilizando o teste da RIFI.....	41
<b>Tabela 4 -</b>	Animais positivos no teste de ELISA classificados por Níveis de ELISA de acordo com a densidade óptica crescendo a cada nível 35% .....	42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO .....	23
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> – Prevalência de anticorpos e detecção molecular de <i>Neospora caninum</i> em frangos ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) de criações do norte do Paraná .....	24
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

## 1. INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório e tem como hospedeiro definitivo os canídeos (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011). Estes eliminam os oocistos no ambiente, onde ocorre a fase de esporogonia, contaminando todo o local podendo infectar um grande número de animais domésticos e selvagens. A principal forma de transmissão é horizontal, mas também ocorre na forma vertical, principalmente em bovinos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Com distribuição mundial, os frangos podem ser predados por cães e diversos animais (COSTA et al., 2008). A produção do frango caipira é caracterizada pela forma de criação semi-intensiva, onde os animais têm acesso a um galpão e uma área de pasto durante todo o seu período de criação (CARDOZO; YAMAMURA, 2004). Devido ao hábito de se alimentar no chão, os frangos caipiras podem se infectar com parasitas, sendo um bom indicador para algumas doenças (DUBEY et al., 2010).

As aves se infectam através da ingestão de oocistos esporulados, entretanto, o real papel desses animais no ciclo biológico do *N. caninum* ainda é incerto (DONAHOE et al., 2015). Desta forma, galinhas poderiam se infectar com oocistos esporulados de *N. caninum*, que após o encistamento, se tornariam hospedeiro intermediário. Sendo assim, estudos epidemiológicos nesses animais são de fundamental importância para elucidar o papel dessas aves no ciclo do parasita.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

*Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório de distribuição mundial e é considerado um dos principais causadores de abortamento em bovinos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). O parasita foi descrito pela primeira vez na Noruega por Bjerkås, Mohn e Presthus (1984) que relataram a presença de cistos de protozoários no sistema nervoso central e muscular em cães da raça Boxer, provenientes da mesma ninhada com sinais neurológicos e paresia.

Posteriormente, Bjerkås e Presthus (1988), através de estudos imunohistoquímicos e ultraestruturais, concluíram que os cistos observados nesses cães com sinais neurológicos eram diferentes do *Toxoplasma gondii*, tratando-se de uma nova espécie de parasita. No mesmo ano, Dubey et al. (1988) avaliando cortes histológicos destes cães que morreram com doença concluíram que era um novo parasita e o denominaram de *N. caninum*.

Os canídeos como o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), coiote (*Canis latrans*), dingo australiano (*Canis dingo*) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) são considerados os hospedeiros definitivos do parasita, embora seja capaz de infectar um amplo número de animais domésticos e selvagens (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011). Algumas aves, como galinhas (COSTA et al., 2008), e corvo (SALANT et al., 2015), podem se infectar com o parasita, entretanto o isolamento do parasita foi relatado em bovinos, ovinos, búfalo, lobo cinzento, bisão, e veado da cauda branca (CAMPERO et al., 2015; PENA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2004; DUBEY et al., 2011; CABAJ et al., 2005; WOODS et al., 1994).

Tendo as aves distribuição mundial, estas se tornam presas para diversos animais, incluindo os cães (Costa et al., 2008). Estudos demonstram que algumas espécies de aves, como a galinha (*Gallus gallus domesticus*) e o pardal (*Passer domesticus*) (Costa et al., 2008; Gondim et al., 2010) são hospedeiros intermediários do parasita, entretanto, aves adultas geralmente não manifestam sinais clínicos de neosporose (McGuire et al., 1999. Furuta et al., 2007; Costa et al., 2008; Mineo et al., 2009; Gondim et al., 2010).

As aves são consideradas importantes fontes de avaliação da contaminação ambiental devido à ampla exposição a agentes biológicos e químicos, pelo hábito de se alimentarem no solo por meio da ação de ciscar. Os frangos se

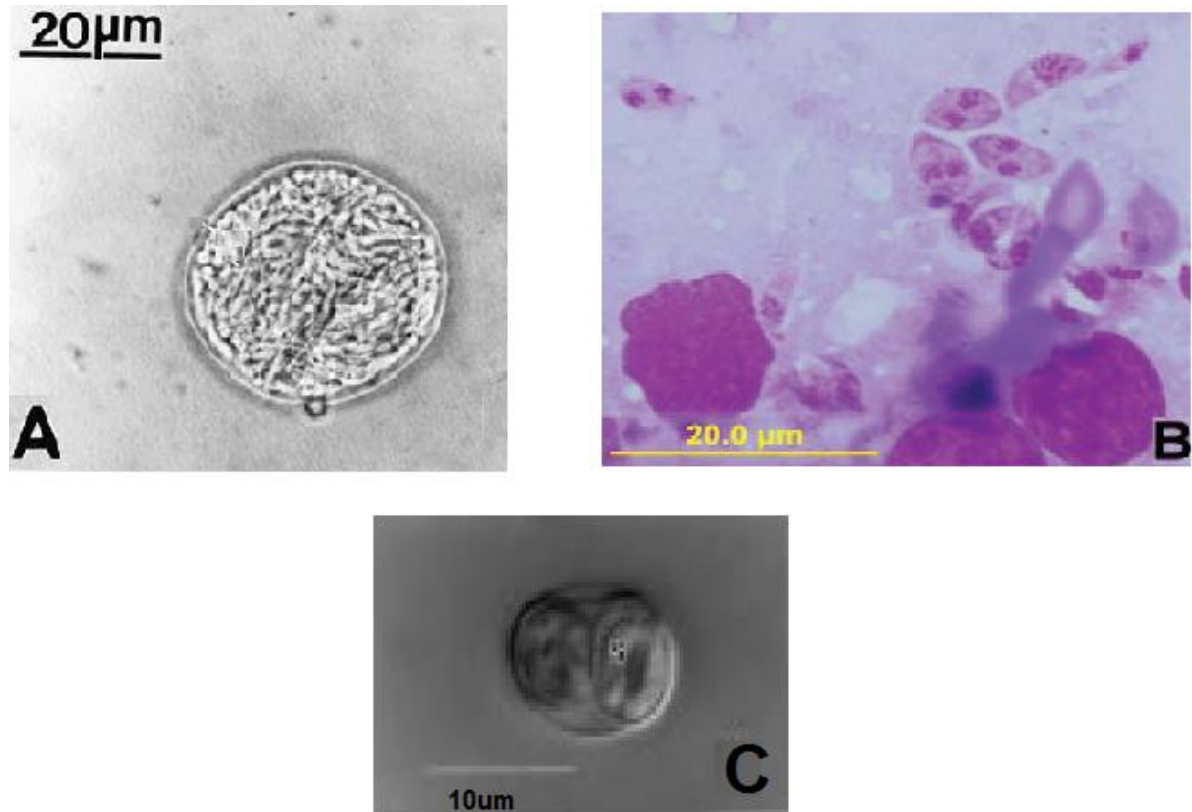
1 infectam pela ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente, entretanto, o  
2 real papel das aves no ciclo biológico do *N. caninum* ainda é incerto (DONAHOE et  
3 al., 2015). Desta forma, frangos poderiam se infectar com oocistos esporulados de  
4 *N. caninum* presentes no ambiente, sendo assim de fundamental importância nos  
5 estudos de epidemiologia do parasita.

6 Baker et al. (1995) realizaram um estudo experimental com aves  
7 carnívoras, eles utilizaram dois Búteo-da-cauda-vermelha (*Buteo jamaicensis*), dois  
8 urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) e dois coruja-das-torres (*Tyto alba*),  
9 para avaliar o potencial destas como hospedeiro definitivo do parasita, porém os  
10 resultados não atenderam às expectativas. Somente em 1998, McAllister et al.  
11 (1998) descreveram os cães domésticos (*Canis familiaris*) como hospedeiros  
12 definitivos, visto que cães infectados com cistos teciduais eliminaram oocistos não  
13 esporulados nas fezes após 8 dias de infecção.

14 O parasita apresenta três formas biológicas distintas: taquizoítos,  
15 bradizoítos e oocistos (Fig.1). Os taquizoítos possuem formato semi-lunar, medem 3-  
16 7 $\mu$ m por 1-5 $\mu$ m, é a fase de multiplicação rápida do parasita, encontrado no interior  
17 de células como hepatócitos, macrófagos alveolares, miócitos, células renais,  
18 endoteliais vasculares e nervosas (BARR et al., 1991; DUBEY et al., 2002). Os  
19 bradizoítos são alongados e delgados, medindo aproximadamente 6,5-8 $\mu$ m por 1,5-  
20 2 $\mu$ m e envoltos por um cisto. Esta é considerada a forma lenta de multiplicação do  
21 parasita, são encontrados principalmente no sistema nervoso central dos  
22 hospedeiros intermediários e definitivos. Os cistos possuem formato arredondado ou  
23 ovalado e variam no tamanho, podendo chegar até 107 $\mu$ m de diâmetro e com  
24 parede de até 4 $\mu$ m (DUBEY et al., 2002, 2004).

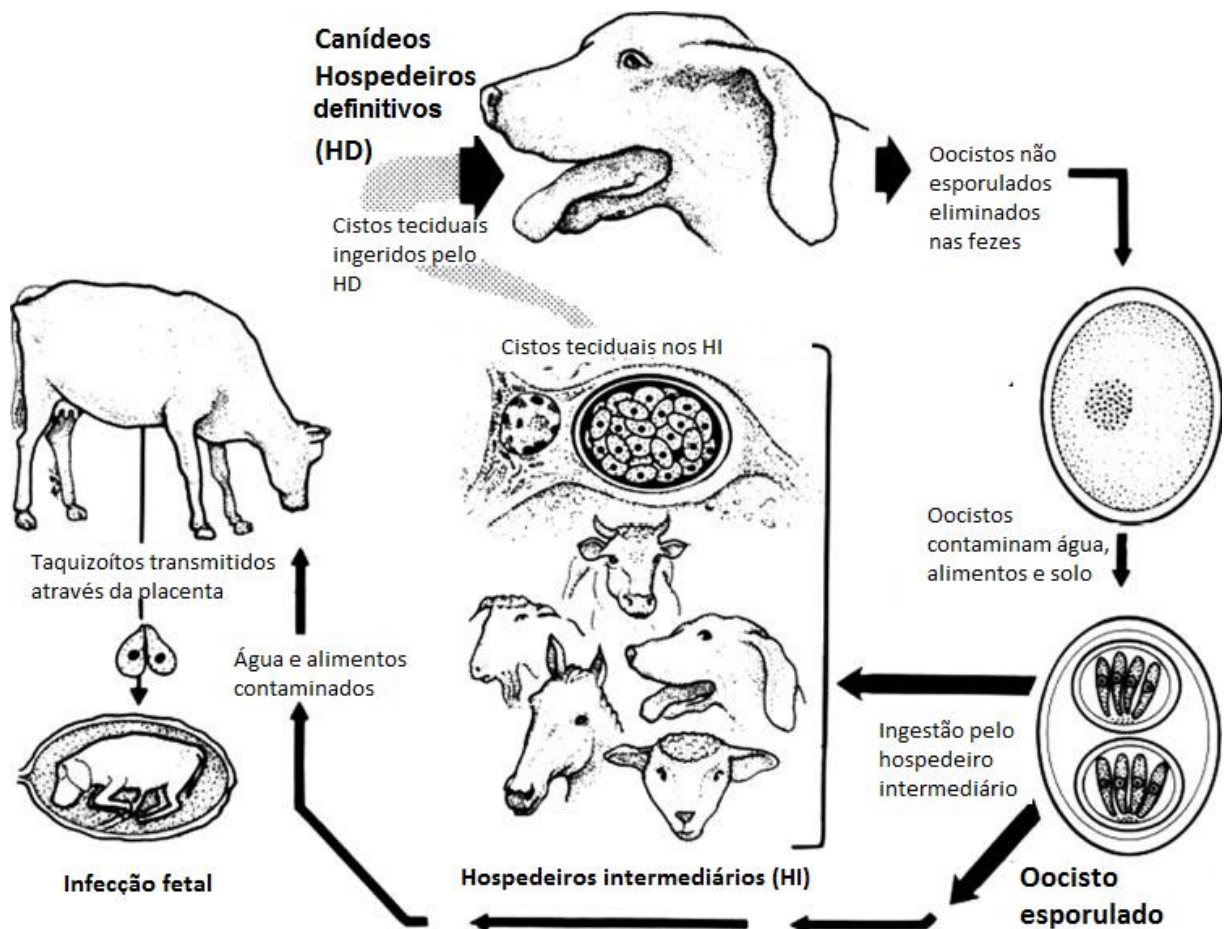
25 Os oocistos são a forma de resistência do parasita no ambiente,  
26 medem 10,6 $\mu$ m-12,4 $\mu$ m por 10,6 $\mu$ m-12 $\mu$ m e são eliminados nas fezes dos canídeos  
27 na forma não esporulada. Após a esporogonia no ambiente, os oocistos são  
28 compostos por dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos, que são  
29 alongados e medem 5,8-7,0 $\mu$ m por 1,8-2,2 $\mu$ m (DUBEY et al., 2002).

30  
31  
32  
33  
34



**Figura. 1.** Formas parasitárias do *Neospora caninum*. A) Cisto tecidual com bradizoítos no interior. B) Taquizoítos corados com Giemsa. C) Oocisto esporulado. Fonte: Adaptado de Lindsay; Upton; Dubey, 1999; Dubey et al., 2004; Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007.

O ciclo biológico do parasita (Figura 2) heteroxeno facultativo, é caracterizado pela presença de um canídeo como hospedeiro definitivo, onde irá ocorrer um ciclo sexual enteroepitelial, ainda não completamente elucidado, culminando com a eliminação de oocistos não esporulados nas fezes, e de um hospedeiro intermediário, onde ocorrerá uma fase de multiplicação assexuada, culminando com a formação de cistos teciduais (DUBEY; SCHARES, 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).



**Figura 2.** Ciclo Biológico do *Neospora caninum*. Fonte: Adaptado de Dubey; Schares; Ortega-Mora, 2007.

Os hospedeiros definitivos e intermediários se infectam por duas principais vias, horizontal e vertical. A transmissão horizontal ocorre quando oocistos esporulados são ingeridos com água e alimentos contaminados ou por ingestão de tecidos de hospedeiros intermediários contendo cistos teciduais. Já a transmissão vertical, também chamada de transmissão transplacentária, é bastante comum nos bovinos e ocorre quando taquizoítos atravessam a barreira placentária e infectam o feto durante a gestação (DUBEY; SCHARES, 2006; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Vacas prenhes cronicamente infectadas podem ter uma re-agudização da doença, levando à uma disseminação de taquizoítas e consequente infecção fetal (WILLIAMS et al., 2009).

Atualmente existem vários testes disponíveis para o diagnóstico

1 sorológico da neosporose, como o teste de aglutinação (NAT), a imunofluorescência  
 2 indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o immunoblot (DUBEY;  
 3 SCHARES, 2011). Entretanto, a RIFI é considerada como prova padrão para o  
 4 sorodiagnóstico devido à baixa reatividade cruzada com outros parasitas coccídios  
 5 (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999).

6 Barros et al. (2018) em sua revisão demonstrou que no Brasil temos  
 7 quatro estudos de *N. caninum* em frangos caipiras feitos por Costa et al. (2008) e  
 8 Martins et al. (2011), Gonçalves et al. (2012) e Camilo et al. (2015).

9  
 10 **Tabela 1.** Estudos desenvolvidos no Brasil com frangos de criação livre e  
 11 confinados.

AUTOR	TÉCNICA UTILIZADA	POSITIVOS (%)
<b>Costa et al. (2008)</b>	RIFI e PCR	25% (50/400) e 60% (6/10)
<b>Martins et al. (2011)</b>	RIFI	34,3% (123/358)
<b>Gonçalves et al. (2012)</b>	RIFI e PCR	17% (17/100) e 6% (6/100)
<b>Camilo et al. (2015)</b>	RIFI	36,5% (50/137)

12

13 O isolamento do parasita pode ser realizado em animais ou cultivo  
 14 celular e é de difícil realização devido à baixa concentração de parasitas em animais  
 15 naturalmente infectados, além dos custos elevados e questões bioéticas envolvidas  
 16 (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

17 Métodos moleculares como a PCR convencional e nested-PCR são  
 18 técnicas de elevada sensibilidade e especificidade, sendo aplicáveis à uma ampla  
 19 variedade de amostras biológicas. O gene Nc5 e a região do espaçador transcrito  
 20 interno 1 (ITS-1) do RNA são os marcadores mais comumente utilizados para  
 21 detecção do parasita, sendo o ITS-1 também utilizado para análises filogenéticas,  
 22 pois apresenta regiões conservadas intraespécie e variáveis interespecies,  
 23 permitindo assim a diferenciação entre outros coccídios (GONDIM et al., 2004;  
 24 DUBEY; SCHARES, 2006; DONAHOE et al., 2015).

25 Dentre os estudos que utilizaram a técnica de PCR para detectar  
 26 DNA de *N. caninum* em tecidos de frangos caipiras no Brasil, Costa et al. (2008)  
 27 detectou o DNA do parasita em seis animais dentre os dez testados; Munhoz et al.  
 28 (2014) e Oliveira et al. (2018) não detectaram o DNA do parasita nos frangos  
 29 inoculados experimentalmente após 60 dias da inoculação.



1                    Uma possível explicação pela não detecção do DNA nos tecidos  
2 dos frangos, pode ser explicado pelo estudo feito por Rezende-Gondim et al (2017)  
3 onde demonstrou em cultivo celular que o *N. caninum* perde seu poder de  
4 infectividade e invasão celular em altas temperaturas. Amostras da cepa NC-1, NC-  
5 Liverpool e NC-Bahia foram mantidas em estufas de CO<sub>2</sub> e tiveram a temperatura  
6 aumentada gradativamente durante as semanas (37°C até 41,5°C). Foi observado  
7 um crescimento até 39°C, em temperaturas acima de 39°C foi observado uma  
8 redução drástica no crescimento; e após 2 semanas mantidas 39°C as cepas NC-1 e  
9 NC-Bahia se tornaram negativas na PCR e a cepa NC-Liverpool tornou-se negativa  
10 3 semanas após ser mantida a 39°C.  
11

## Referências

- 1  
2 BAKER, D. G.; MORISHITA, T. Y.; BROOKS, D. L.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S.;  
3 DUBEY, J. P. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive  
4 hosts of *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 783–785,  
5 1995.
- 6 BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like  
7 protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28,  
8 n. 2, p. 110–116, 1991.
- 9 BARROS, L. D.; TARODA, A.; MARTINS, T. A.; MIURA, A. C.; SEIXAS, M. de;  
10 SAMMI, A. S.; SASSE, J. P.; MINUTTI, A. F.; CUNHA, I. A. L. da; VIDOTTO, O.;  
11 GARCIA, J. L.. Survey of *Neospora caninum* in eared doves (*Zenaida auriculata*) in  
12 Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 174, p. 132-135, 2017.
- 13  
14 BARROS, L. D.; MIURA, A.C.; MINUTTI, A.F.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J.L..  
15 *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology International**, v. 67, n. 4, p. 397-  
16 402, 2018.
- 17  
18 BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon  
19 causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**  
20 **(Berlin, Germany)**, v. 70, n. 2, p. 271–274, 1984.
- 21 BJERKAS, I.; PRESTHUS, J. Immuno-histochemical and ultrastructural  
22 characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and  
23 myositis in dogs. **Apmis**, v. 96, n. 5, p. 445–454, 1988.
- 24 BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection.  
25 **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497–1507, 1999.
- 26 CAMPERO, L. M.; VENTURINI, M. C.; MOORE, D. P.; MASSOLA, L.;  
27 LAGOMARSINO, H.; GARCIA, B.; BACIGALUPE, D.; RAMBEAUD, M.; PARDINI, L.;  
28 LEUNDA, M. R.; SCHARES, G.; CAMPERO, C. M. Isolation and molecular  
29 characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina.  
30 **Experimental parasitology**, v. 155, p. 8–12, 2015.

- 1 CARDOZO, S. P.; YAMAMURA, M. H.. Parasitas em produção de frangos no  
2 sistema de criação tipo colonial/caipira no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25,  
3 n. 1, p. 63-74, 2004.
- 4 CABAJ, W.; MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; GILL, J.. Antibodies to *Neospora*  
5 *caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in  
6 Poland. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 163-168, 2005.
- 7 COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.  
8 O.; ARAÚJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus*  
9 *domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International**  
10 **Journal for Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 157–159, 2008.
- 11 DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. a.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.;  
12 ŠLAPETA, J.. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum*  
13 infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**,  
14 v. 4, n. 2, p. 216–238, 2015.
- 15 DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J.. Neonatal *Neospora*  
16 *caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental  
17 transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n.  
18 10, p. 1259–63, 1988.
- 19 DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.;  
20 BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.;  
21 HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.;  
22 KOUDELA, B.; MRSH, A.E.; MATTSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.;  
23 OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.;  
24 WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S.. Redescription of *Neospora caninum* and its  
25 differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32,  
26 n. 8, p. 929-946, 2002.
- 27 DUBEY, J. P.; SREEKUMAR, C.; KNICKMAN, E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C. B.;  
28 KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S.; GREENE, C. E.  
29 Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates  
30 from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1157–

- 1 1167, 2004.
- 2 DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary**  
3 **Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 1–34, 2006.
- 4 DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of  
5 neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 2, p.  
6 323-367, 2007.
- 7 DUBEY, J. P.; RARJENDRAN, C.; COSTA, D.G.C.; FERREIRA, L. R.; KEOK,  
8 O.C.H.; QU, D.; SU, C.; MARVLOS, M.F.V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A., SILVA, J. C.  
9 R.. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the  
10 Fernando de Noronha, Brazil: unexpectes findings. **Journal of Parasitology**, 96(4),  
11 p. 709-712, 2010.
- 12 DUBEY, J. P.; JENKINS, M.C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.;  
13 MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S.. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural  
14 definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 2-4, p.  
15 382-387, 2011.
- 16 DUBEY, J. P., JENKINS, M. C.; FERREIRA, L. R., CHOUDHARY, S.; VERMA, S. K.;  
17 KWOK, O. C.; FETTERER, R.; BUTLER, E. CARSTENSEN, M... Isolation of viable  
18 *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). **Veterinary**  
19 **parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 150-153, 2014.
- 20 FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.;  
21 MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infections in birds: experimental infection in  
22 chicken and embryonated eggs. **Parasitology**. v.134, p. 1931-1939, 2007.
- 23 GONDIM, L. F. P.; LASKI, P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Variation of the internal  
24 transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of  
25 *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 119–122, 2004.
- 26 GONDIM, L. S. Q.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S. A.; SANTOS, S.  
27 L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; GONDIM, L. F. P. *Toxoplasma gondii* and  
28 *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil.  
29 **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 121–124, 2010.

- 1 KING, J. S.; ŠLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.;  
2 WINDSOR, P. A. *Australian dingoes* are definitive hosts of *Neospora caninum*.  
3 **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945–950, 2010.
- 4 LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora*  
5 *caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1521–1523,  
6 1999.
- 7 MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.;  
8 MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International**  
9 **Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473–1478, 1998.
- 10 MCGUIRE, A.M.; MCALLISTER, M.; WILLS, R.A.; TRANAS, J. Experimental  
11 inoculation of domestic pigeons (*Columba livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*)  
12 with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology** v.29, p.  
13 1525-1529, 1999.
- 14 MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO,  
15 A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for  
16 *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology** v. 159, p. 149-153,  
17 2009.
- 18 PENA, H. F.; SOARES, R. M.; RAGOZO, A. M.; MONTEIRO, R. M.; YAI, L. E.;  
19 NISHI, S. M.; GENNARI, S. M.. Isolation and molecular detection of *Neospora*  
20 *caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147,  
21 n. 1-2, p. 61-66, 2007.
- 22 REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L. F. P.;  
23 ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the  
24 billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133–  
25 42, 2013.
- 26 REZENDE-GONDIM, M. M.; SILVA, A. V.; SCHARES, G.; GONDIM, L. F.P.. In  
27 contrast to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* tachyzoites did not sustain  
28 multiplication in vitro at increased incubation temperatures. **Veterinary Parasitology**,  
29 v. 234, p. 19-24, 2017.

- 1 SALANT, H.; MAZUZ, M. L.; SAVITSKY, I.; NASEREDDIN, A.; BLINDER, E.;  
2 BANETH, G. *Neospora caninum* in crows from Israel. **Veterinary Parasitology**, v.  
3 212, n. 3-4, p. 375–378, 2015.
- 4 WILLIAMS, D. J. L.; HARTLEY, C. S.; BJÖRKMAN, C.; TREES, A.J. Endogenous  
5 and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of  
6 transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v. 136,  
7 n. 14, p. 1895–1900, 2009.
- 8 WOODS, L. W. et al. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer  
9 (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of veterinary diagnostic**  
10 **investigation**, v. 6, n. 4, p. 508-510, 1994.

11

1 **3. OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4 Avaliar a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* e detectar o  
5 parasita em tecidos de frangos de vida livre (*Gallus gallus domesticus*) do norte do  
6 Paraná.

7

8 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

9 Padronizar um ELISA com antígenos totais para detectar anticorpos  
10 IgY anti-*N. caninum* em frangos.

11 Comparar os testes de imunofluorescência Indireta e ELISA indireto.

12 Detectar DNA do parasita em amostras de tecidos das aves.

13

14

#### 4. ARTIGO

**Prevalência de anticorpos e detecção molecular de *Neospora caninum* em frangos (*Gallus gallus domesticus*) de criações do norte do Estado do Paraná, Brasil.**

**Prevalence of antibodies and molecular detection of *Neospora caninum* in free range chickens (*Gallus gallus domesticus*) from the north of Paraná State, Brazil.**

#### RESUMO

*Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório de distribuição mundial, capaz de infectar um amplo número de animais domésticos e selvagens, incluindo as aves. Estas são consideradas importantes fontes de avaliação da contaminação ambiental devido à ampla exposição a agentes biológicos e químicos, podendo se infectar através da ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente, entretanto, o real papel das aves no ciclo biológico do *N. caninum* ainda é incerto. Este trabalho teve como objetivos avaliar a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* e detectar molecularmente o parasita em frangos de criações do norte do Paraná. Foram realizados testes de RIFI e ELISA para a pesquisa de anticorpos e a reação de PCR para detecção de DNA do parasita nos tecidos destas aves. Foram avaliados frangos caipira oriundos de 25 propriedades da região norte do estado do Paraná. Para a pesquisa de anticorpos contra o *N. caninum* no soro dos frangos foram realizadas as técnicas de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), e para detecção do DNA do parasita nos tecidos (cérebro, coração, fígado e pulmão) das aves soropositivas na RIFI, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dos 366 frangos, 65 (17,8%) e 166 (44,6%) foram soropositivos para RIFI e ELISA, respectivamente, e nenhuma amostra tecidual se apresentou positiva na PCR. Os frangos apresentaram uma prevalência de anticorpos relativamente alta, porém não se apresentam como bons animais para manterem o parasita ou possível fonte de infecção para demais animais carnívoros, e nos testes sorológicos a RIFI se apresentou como uma técnica mais sensível para a detectar o parasita.

**Palavras-chave:** Frango caipira. RIFI. ELISA. PCR.



1

**ABSTRACT**

2 *Neospora caninum* is an obligate intracellular parasite of whole world, is able to to  
3 infect many animals domestics and wilds, included the birds. These to important  
4 sources to evaluated environmental contamination due to extensive exposure to  
5 biologics and chemical agents, being able infect through oocysts sporulated present  
6 in environment, however, the real role of birds in the cycle biological to *N. caninum*  
7 still is uncertain. This study aimed to evaluate prevalence to antibodies anti-*N.*  
8 *caninum* and to detect molecularly the parasite in free range chickens from the north  
9 of Paraná. Were realized tests of IFA and ELISA for search antibodies and PCR  
10 assay for detection DNA to parasite in tissues this birds. Were evaluated free range  
11 chickens from to 25 farms from north of Paraná state. For research to antibodies anti-  
12 *N. caninum* in serum the free range chickens techniques were performed  
13 Immunofluorescence assay (IFA) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay  
14 (ELISA) and to detected DNA to parasite in tissues (brain, heart, liver and lung), this  
15 seropositive birds in IFA, were realized Polymerase Chain Reaction (PCR). Of the  
16 366 free range chickens, 65 (17,8%) and 166 (44,6%) were seropositive for IFA and  
17 ELISA, respectively, and no sample were positive in PCR. The free range chickens  
18 showed relatively high prevalence to antibodies, however not a good animals for  
19 maintenance to parasite or possible source to infection for others carnivorous  
20 animals, and the tests serologicals the IFA presented for a technique more sensitive  
21 for detected to parasite.

22

23 **Key words:** Free range chicken. IFA. ELISA. PCR.

24

## 1 **Introdução**

2 Os hospedeiros definitivos do *N. caninum*, até o momento, são cão doméstico  
3 (*Canis lupus familiaris*), coioete (*Canis latrans*), dingo australiano (*Canis lupus dingo*)  
4 e o lobo cinzento (*Canis lupus*), no entanto, esse parasita é capaz de infectar um  
5 amplo número de animais domésticos e selvagens (McAllister et al., 1998; Gondim et  
6 al., 2004; King et al., 2010).

7 *Neospora caninum* já foi descrito em algumas aves, tais como, galinhas  
8 (COSTA et al., 2008), corvo (SALANT et al., 2015), entretanto, o isolamento do  
9 parasita foi relatado em bovinos, ovinos, búfalos, lobo cinzento, bisão e veado-da-  
10 cauda-branca (CAMPERO et al., 2015; PENA, 2007; RODRIGUES, 2004; GONDIM  
11 et al., 2010; Dubey et al., 2011; Cabaj et al. 2005; Woods, 1994).

12 As aves são consideradas importantes fontes de avaliação da contaminação  
13 ambiental devido à ampla exposição a agentes biológicos e químicos, estas se  
14 infectam através da ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente,  
15 entretanto, o real papel das aves no ciclo biológico do *N. caninum* ainda é incerto  
16 (DONAHOE et al., 2015).

17 Este trabalho teve como objetivos avaliar a prevalência de anticorpos e  
18 detectar molecularmente *N. caninum* em frangos de criações do norte do Paraná.

19

## 20 **Material e Métodos**

21

### 22 **Animais**

23 O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da  
24 Universidade Estadual de Londrina (CEEA Nº 64/10).

25 Para o cálculo do tamanho da amostragem, assumindo 50% de prevalência  
26 na população, nível de confiança de 95% e eficácia de 5%, foi utilizado o programa  
27 Epi Info versão 3.5.4 (DEAN et al., 2012).

28 No período de 2012 a 2014 foram coletadas 366 amostras de tecido e soro de  
29 frangos caipira, oriundos de propriedades rurais da região norte do estado do  
30 Paraná (Figura 1). Foram utilizados soro e tecidos (cérebro, coração, fígado,  
31 pulmão) para sorologia e detecção de DNA, respectivamente.

32

33

34

## 1 **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

2 A análises sorológicas para a verificação da presença de anticorpos contra *N.*  
3 *caninum* em soro de frangos foi realizada pela técnica de Imunofluorescência  
4 Indireta (RIFI), segundo Camargo (1974) A amostras foram diluídas na proporção de  
5 1:16 até 1:4096. As amostras foram consideradas positivas as que apresentaram  
6 total contorno do taquizoíto com fluorescência e a partir do título 16.

## 8 **Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)**

9 O Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) foi realizado conforme  
10 metodologia descrita previamente com algumas modificações (Paré et al., 1995).  
11 Taquizoítos obtidos previamente de células de cultivo foram submetidos à um  
12 processo de congelamento e descongelamento e posterior sonicação para utilização  
13 da porção solúvel das proteínas para realização do teste sorológico. A adsorção foi  
14 realizada em microplacas de 96 poços (Nunc-Immuno Plate Maxisorp, Dinamarca)  
15 em tampão carbonato (0,1M, pH 9,6), com 2,5µg/ml de proteínas e incubadas a 4°C  
16 overnight. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20  
17 (50mM Tris, 150mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,4) e bloqueada com tampão  
18 carbonato contendo 8% de leite em pó desnatado (200uL por poço). As placas foram  
19 incubadas por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas conforme descrito  
20 anteriormente. Os soros diluídos 1:100 em PBS-Tween 20% acrescido de leite em  
21 pó 5%, serão adicionados na placa (100µl em duplicata) e incubadas novamente à  
22 37°C por 1 hora. Após outro ciclo de lavagem, foi adicionado 100µl de conjugado  
23 anti-galinha IgY (Sigma, EUA) marcado com peroxidase diluído em PBS-Tween 20%  
24 acrescido de 5% de leite em pó, sendo as placas novamente incubadas. Após outro  
25 ciclo de lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada por meio da adição de  
26 100µL de TMB em cada poço. A reação foi interrompida por meio da adição de 50µl  
27 de ácido clorídrico (HCl 1N). A densidade óptica avaliada no comprimento de 490 nm  
28 em leitor de microplacas (Bio-Rad, EUA). Soros controles positivos e negativos  
29 foram adicionados em todas as placas. O ponto de corte foi calculado pela análise  
30 da DO média dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão do controle  
31 negativo. No teste de ELISA os resultados das amostras foram separados em níveis  
32 de acordo com o valor da correção da DO, cada nível foi aumentado em 35%  
33 (Machado et al., 1997).

## 1 **Digestão Péptica de Tecidos**

2 Um *pool* de órgãos (10g de cada órgão, cérebro, coração, pulmão e fígado)  
3 foram processados para a realização da digestão péptica, conforme descrito por  
4 (DUBEY, 1998). Os órgãos foram triturados em solução salina, adicionado ao fluido  
5 digestivo artificial (0,26g de pepsina, 0,5g de NaCl, 0,7mL de HCl e 50mL de água  
6 destilada q.s.p.) e agitado por uma hora em estufa a 37°C. O produto da digestão foi  
7 filtrado e centrifugado a 1200g/10min. O sobrenadante foi então descartado e o  
8 sedimento neutralizado em solução de bicarbonato 1,2%. A solução foi  
9 ressuspensa em solução fisiológica e centrifugada novamente. Em seguida foi  
10 desprezado o sobrenadante, adicionado 300µL de pentabiótico e 1mL armazenado a  
11 -20°C.

## 13 **Extração de DNA**

14 Os animais considerados positivos na RIFI tiveram seus tecidos testados pela  
15 PCR. Amostras de 60 cérebros (300µL), 65 macerados de tecidos (100µL de cada  
16 órgão, coração, fígado e pulmão), foram submetidas a extração de DNA conforme  
17 descrito por Garcia et al. (2006). As amostras foram homogeneizadas (300µL) e  
18 transferidas para o microtubo com igual volume do tampão de extração (200 mM  
19 NaCl, 20 mM Tris, 50 mM EDTA, proteinase K 1 mg/ml, and 2% SDS) e incubada a  
20 56°C por 1h. Após, foi adicionado fenol tamponado (300µl) e centrifugado a 13.000g  
21 por 5 min. O resultante da fase aquosa foi transferido para outro microtubo, onde o  
22 fenol:clorofórmio:alcoól isoamilico foi adicionado e centrifugado a 13.000g por 5 min.  
23 A precipitação de DNA foi realizada por acetato e álcool (Sambrook et al., 1989)

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

26 A reação em cadeia da polimerase foi realizada para detecção do DNA do  
27 parasita em amostras de tecidos dos frangos. A sequência de DNA-alvo amplificada  
28 por meio da utilização dos oligonucleotídeos indicadores Np6 plus (5'-  
29 CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') e Np21 plus (5'-  
30 GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3') conforme descrito anteriormente por Hughes  
31 et al. (2006), que amplificam um fragmento de 337 pb do gene Nc5 do DNA  
32 genômico do *N. caninum*. A reação foi realizada utilizando uma concentração  
33 aproximada de 100ng/uL de DNA, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTP  
34 (Invitrogen, EUA), 1 µM de cada primer, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,4,

1 50mM KCl)), 1,25U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen, EUA), e H<sub>2</sub>O Mili-Q estéril  
2 perfazendo um total de 25µL. A termociclagem foi feita em aparelho TC-512  
3 (TECHNE – USA) de acordo com a seguinte programação: 95°C por 5 minutos para  
4 desnaturação inicial, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 63 por  
5 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão e uma extensão  
6 final a 72°C por 5 minutos. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas  
7 as reações. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de  
8 agarose 1,5% corados com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) e  
9 visualizados e fotodocumentos sobre luz UV por meio do transiluminador Locus L –  
10 PIX EX, Locus biotecnologia).

## 11

### 12 **Análise Estatística**

13 Para a avaliação do ELISA foi utilizado o valor de Kappa descrito por Cohen  
14 (1960) e para sua interpretação foi utilizada a tabela proposta por Landis e Koch  
15 (1977). A sensibilidade e especificidade foram calculadas utilizando a RIFI como  
16 teste ouro (CASSARTELLI-ALVES et al., 2014).

### 17

### 18 **Resultados e Discussão**

19 Das 366 amostras de soro analisadas 65 (17,8%) e 163 (44,6%) foram  
20 positivas na RIFI e no ELISA, respectivamente (Tabela 1). Na RIFI 56 (86,26%)  
21 amostras apresentaram titulação de 16 e apenas um animal com título de 256  
22 (Tabela 2).

23 No Brasil quatro trabalhos descreveram a prevalência de anticorpos contra *N.*  
24 *caninum* em frangos através da técnica da RIFI; Costa et al. (2008) na Bahia,  
25 encontraram positividade de 23,5%; Martins et al. (2011) utilizou amostras de  
26 diversas localidades do Brasil e encontraram uma positividade de 34,3%; Gonçalves  
27 et al. (2012) na Bahia observaram uma positividade de 17% e Camillo et al. (2015)  
28 no Rio Grande do Sul obtiveram 36,5% de positividade. Destacam-se os trabalhos  
29 de Costa et al. (2008) e Gonçalves et al. (2012) com resultados semelhantes ao  
30 observado no presente estudo.

31 Em outros países, dois estudos utilizaram a RIFI para determinar a  
32 positividade para *N. caninum* em frangos. Nas Américas do Norte, Central e do Sul,  
33 Martins et al. (2011) verificaram 41,5% de animais positivos, e Feng et al. (2016)  
34 verificaram 23,1% na China. Sayari et al. (2016) detectaram uma positividade de

1 17% em frangos no Irã, semelhante a encontrada no presente estudo, porém, a  
2 técnica utilizada foi a *Neospora caninum* Modified Agglutination Test (N-MAT).

3 No teste de ELISA os resultados observados foram de 203 (55,5%) animais  
4 classificados no nível zero, sendo este o primeiro nível e os animais considerados  
5 negativos. Os demais níveis foram enquadrados os animais positivos, com destaque  
6 para o nível quatro com 31 (8,5%) animais (Tabela 4).

7 Ibrahim et al. (2013), utilizaram a técnica de ELISA com a proteína de base  
8 NcSAG1t e detectaram uma positividade de 15,5% em cinco localidades do Egito,  
9 diferindo do nosso estudo, que na técnica de ELISA utilizamos antígeno total,  
10 podemos observar uma positividade de 44,6% (163); sendo um percentual alto de  
11 positivos.

12 O ELISA testado não apresentou boa sensibilidade, este fato pode ser  
13 explicado pela utilização de antígeno total, com isso pode haver algumas reações  
14 cruzadas com demais proteínas internas presentes em protozoários pertencentes ao  
15 Filo Apicomplexa.

16 Das 65 aves testadas pela PCR nenhuma foi positiva. Quanto a reação de  
17 PCR resultados semelhantes ao presente estudo foram observados por Feng et al.  
18 (2016), onde o DNA do *N. caninum* não foi detectado em galinhas naturalmente  
19 infectadas. Uma explicação para essa falta de capacidade do parasita se manter nos  
20 tecidos dessas aves foi descrito por Rezende-Gondim et al. (2017) que  
21 demonstraram uma baixa capacidade de multiplicação das cepas de *N. caninum*  
22 (NC-1, Liverpool, e NC-Bahia) em temperaturas acima de 39°C até 41,5°C *in vitro*,  
23 as quais são temperaturas corporais normais de aves.

24 A resistência à inoculação experimental em relação ao *N. caninum* por  
25 frangos foi observada por Munhoz et al. (2014), em que frangos com até 42 dias pós  
26 infecção podem apresentar anticorpos do parasita, mas em quantidade muito baixa;  
27 foi também observado que após 60 dias pós-infecção estes se tornam negativos,  
28 zerando os níveis de anticorpos contra *N. caninum* e o DNA do parasita não foi  
29 detectado nos tecidos destes frangos.

30 Oliveira et al. (2018) demonstraram em seu estudo com inoculação  
31 experimental de dois grupos de frangos, um com oocisto e outro com taquizoítos,  
32 onde após 60 dias pós-infecção os animais não desenvolveram anticorpos contra o  
33 *N. caninum* e na técnica de PCR não foi detectado DNA do parasita nos tecidos dos

- 1 animais eutanaziados. Isso demonstra que os frangos apresentam resistência a
- 2 infecção experimental e eliminam o *N. caninum* do organismo.
- 3

## 1 5. CONCLUSÃO

2

3 Conclui-se que os frangos, embora apresentem uma prevalência de  
4 anticorpos alta, não são bons animais para manter cistos teciduais de *N. caninum*,  
5 ou possíveis fontes de infecção para outros animais carnívoros, como por exemplo  
6 os cães. Verifica-se, que a RIFI foi uma técnica mais sensível para detectar  
7 anticorpos contra *N. caninum* quando comparado com a técnica de ELISA  
8 padronizado no presente trabalho. Em relação ao *N. caninum* os frangos não se  
9 apresentaram como bons modelos para estudo de contaminação ambiental por  
10 oocistos deste parasita.

11



## Referências

- 1
- 2 BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon  
3 causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**  
4 (Berlin, Germany), v. 70, n. 2, p. 271–274, 1984.
- 5
- 6 BJERKAS, I.; PRESTHUS, J. Immuno-histochemical and ultrastructural  
7 characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and  
8 myositis in dogs. **Apmis**, v. 96, n. 5, p. 445–454, 1988.
- 9
- 10 CABAJ, W.; MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; GILL, J.. Antibodies to *Neospora*  
11 *caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in  
12 Poland. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 163-168, 2005.
- 13 CAMARGO M (1974) Introdução às técnicas de Imunofluorescência. **Revista**  
14 **Brasileira de Patologia Clínica** 10:143–171
- 15
- 16 CAMILLO, G.; CADORE, G.; FERREIRA, M.; BRAÜNIG, P.; MACIEL, J.; PIVOTO,  
17 F.; SANGIONI, L.; VOGEL, F.; *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies  
18 in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil, **Revista Brasileira Ciência**  
19 **Avícola** 17 (2015), 263–265. <http://dx.doi.org/10.1590/1516-635x1702263-265>
- 20
- 21 CAMPERO, L. M.; VENTURINI, M. C.; MOORE, D. P.; MASSOLA, L.;  
22 LAGOMARSINO, H.; GARCIA, B.; BACIGALUPE, D.; RAMBEAUD, M.; PARDINI, L.;  
23 LEUNDA, M. R.; SCHARES, G.; CAMPERO, C. M. Isolation and molecular  
24 characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina.  
25 **Experimental parasitology**, v. 155, p. 8–12, 2015.
- 26
- 27 CASARTELLI-ALVES, L.; BOECHAT, VC; MACEDO-COUTO, R.; FERREIRA L.C.;  
28 NICOLAU, J.L., NEVES, L.B.; MILLAR, P.R.; VICENTE, R.T.; OLIVEIRA, R.V.;  
29 MUNIZ, A.G.; BONNA, I.C.; AMENDOEIRA, M.R.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.;  
30 SCHUBACH, T.M.; MENEZES, R.C.. Sensitivity and specificity of serological tests,  
31 histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii*  
32 infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, 204(3–4):346–351.  
33 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.039>

- 1 COHEN, Jacob. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and**  
2 **psychological measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.
- 3
- 4 COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZÊDA, R. S.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A.  
5 O.; ARAÚJO, F. R.; MCALLISTER, M. M.; GONDIM, L. F. P. Chickens (*Gallus*  
6 *domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International**  
7 **Journal for Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 157–159, 2008.
- 8
- 9 BARROS, L. D.; TARODA, A.; MARTINS, T. A.; MIURA, A. C.; SEIXAS, M. DE;  
10 SAMMI, A. S.; SASSE, J. P.; MINUTTI, A. F.; CUNHA, I. A. L. DA; VIDOTTO, O.;  
11 GARCIA, J. L.. Survey of *Neospora caninum* in eared doves (*Zenaida auriculata*) in  
12 Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 174, p. 132-135, 2017.
- 13
- 14 DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.; ARNER, T. G.; SANGAM, S.; SUNKI, G.; FRIEDMAN,  
15 R.; LANTINGA, M.; ZUBIETA, J.; SMITH, D. C. **Epi Info version 3.5.4**: A Database  
16 and Statistics Program for Public Health Professionals, Centers for Disease Control  
17 and Prevention, Atlanta, Ga, USA, 2012.
- 18
- 19 DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. a.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.;  
20 ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum*  
21 infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**,  
22 v. 4, n. 2, p. 216–238, 2015.
- 23
- 24 DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J.. Neonatal *Neospora*  
25 *caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental  
26 transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n.  
27 10, p. 1259–63, 1988.
- 28
- 29 DUBEY, J.P.. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma*  
30 *gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology** 74(1):75–77, 1998.  
31 [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00135-0)
- 32

- 1 DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of  
2 Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p.  
3 323–367, 2007.
- 4
- 5 DUBEY, J. P.; JENKINS, M.C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.;  
6 MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S.. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural  
7 definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 2-4, p.  
8 382-387, 2011.
- 9 FENG, Y.; LU, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; ZHANG, L.; YANG, Y.. *Toxoplasma gondii* and  
10 *Neospora caninum* in free-range chickens in Henan Province of China. **BioMed**  
11 **research international**, v. 2016, 2016.
- 12
- 13 GONÇALVES, I.N., UZÊDA, R.S., LACERDA, G.A., MOREIRA, R. R. N., ARAÚJO,  
14 F.R., OLIVEIRA, R.H.M., CORBELLINI, L.G., GONDIM, L.F.P.. Molecular frequency  
15 and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia State,  
16 Brazil, **Veterinary Parasitology**. 190 (2012) 74–79.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.007>
- 18
- 19 GONDIM, L. F. P.; LASKI, P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Variation of the internal  
20 transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of  
21 *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 119–122, 2004.
- 22
- 23 HUGHES, J. M; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.N.; TERRY, R.S.;  
24 MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, G.. The prevalence of *Neospora caninum* and  
25 co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal  
26 populations. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 29-36, 2006.
- 27
- 28 IBRAHIM, H. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in chicken samples  
29 from Delta Egypt using a recombinant Nc SAG1 protein-based ELISA. **The Egyptian**  
30 **Journal of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 29-37, 2013.
- 31

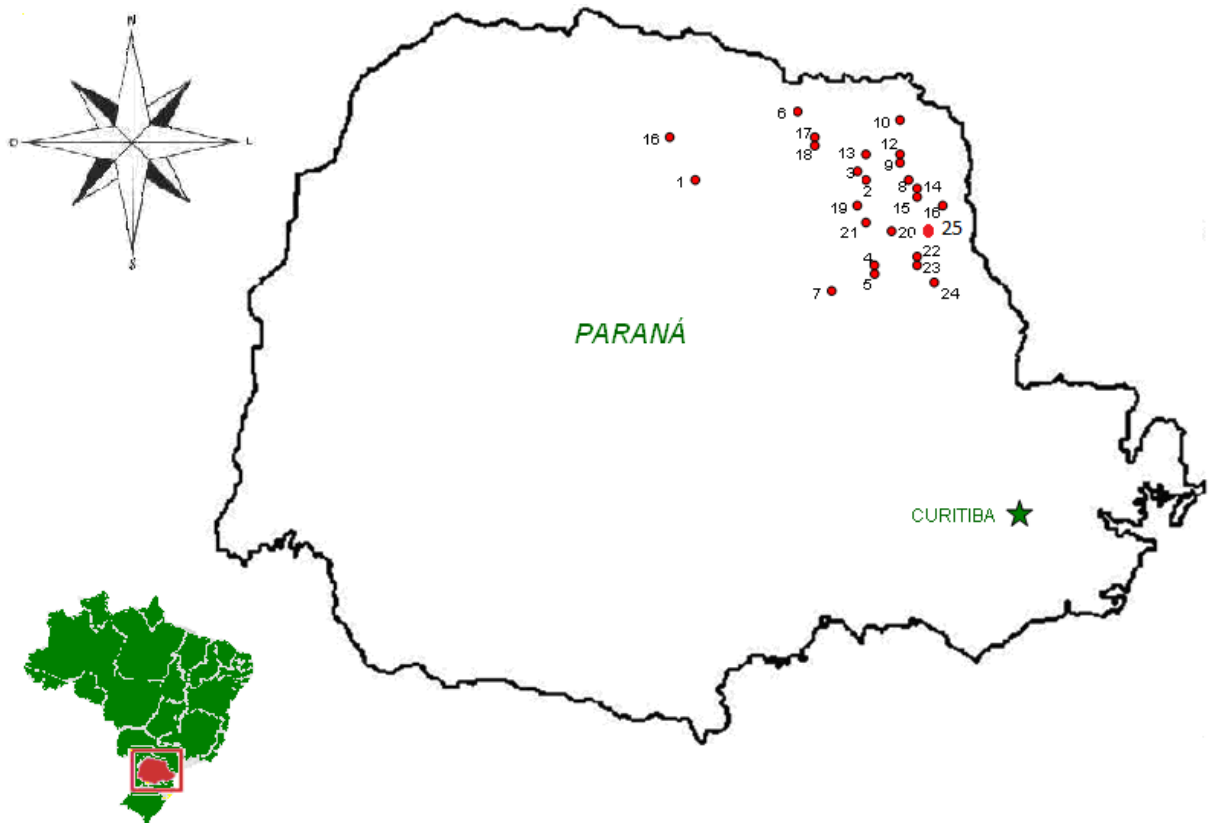
- 1 KING, J. S.; ŠLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.;  
2 WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*.  
3 **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945–950, 2010.  
4
- 5 LANDIS, J.R.; KOCH, G.G.. (1977) The measurement of observer agreement for  
6 categorical data. **Biometrics** 33(1):159–174. <https://doi.org/10.2307/529310>  
7
- 8 MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum*  
9 in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary**  
10 **Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 349–351, 2011.  
11
- 12 MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.;  
13 MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International**  
14 **Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473–1478, 1998.  
15
- 16 MCGUIRE, A.M.; McALLISTER, M.; WILLS, R.A.; TRANAS, J. Experimental  
17 inoculation of domestic pigeons (*Columba livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*)  
18 with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology** v.29, p.  
19 1525-1529, 1999.  
20
- 21 MUNHOZ, ALEXANDRE DIAS; AMARAL, TATIANE FERNANDA DO; GONÇALVES,  
22 LUIZ RICARDO; MORAES, VERA MARIA BARBOSA DE; MACHADO,  
23 ROSANGELA ZACARIAS. *Gallus gallus domesticus* are resistant to infection with  
24 *Neospora caninum* tachyzoites of the NC-1 strain. **Veterinary Parasitology**, v. 206,  
25 n. 3-4, p. 123-128, 2014.  
26
- 27 OLIVEIRA, S.; AIZAWA, J.; SOARES, H. S.; CHIEBAO, D. P.; CASTRO, M. B. DE;  
28 HORA, A. S.; LOPES, M. G.; SCHARES, G.; JENKINS, M. C.; KWOK, O. C. H.;  
29 DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; PENA, H. F. J.. Experimental *Neospora*  
30 *caninum* infection in chickens (*Gallus gallus domesticus*) with oocysts and  
31 tachyzoites of two recent isolates reveals resistance to infection. **International**  
32 **Journal for Parasitology**, v. 48, n.2, p. 117-123, 2018.  
33

- 1 PARÉ, J.P., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C.. An enzyme-linked immunosorbent  
2 assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet.*  
3 **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** 7, 352–359, 1995.  
4 <http://dx.doi.org/10.1177/104063879500700310>  
5
- 6 REZENDE-GONDIM, M. M.; SILVA, A. V.; SCHARES, G.; GONDIM, L. F.P.. In  
7 contrast to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* tachyzoites did not sustain  
8 multiplication in vitro at increased incubation temperatures. **Veterinary Parasitology**,  
9 v. 234, p. 19-24, 2017.  
10
- 11 SALANT, H.; MAZUZ, M. L.; SAVITSKY, I.; NASEREDDIN, A.; BLINDER, E.;  
12 BANETH, G. *Neospora caninum* in crows from Israel. **Veterinary Parasitology**, v.  
13 212, n. 3-4, p. 375–378, 2015.  
14
- 15 SAMBROOK, J., FRITSHC, E.F., MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning: a  
16 Laboratory Manual, second ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.  
17
- 18 SAYARI, M.; NAMAVARI, M.; MOJAVER, S. Seroprevalence of *Neospora caninum*  
19 infection in free ranging chickens (*Gallus domesticus*). **Journal of Parasitic**  
20 **Diseases**, v. 40, n. 3, p. 845-847, 2016.  
21
- 22 VIEIRA, F. E. G.; SASSE, J. P.; MINUTTI, A. F.; MIURA, A. C.; BARROS, L. D. de;  
23 CARDIM, S. T.; MARTINS, T. A.; SEIXAS, M.; YAMAMURA, M. I.; SU, C.; GARCIA,  
24 J. L.. *Toxoplasma gondii*: prevalence and characterization of new genotypes in free-  
25 range chickens from south Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 3, p. 681-688,  
26 2018.  
27
- 28 WILLIAMS, D. J. L.; HARTLEY, C. S.; BJÖRKMAN, C.; TREES, A.J. Endogenous  
29 and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of  
30 transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v. 136,  
31 n. 14, p. 1895–1900, 2009.  
32

1 WOODS, L. W. et al. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer  
2 (*Odocoileus hemionus columbianus*). **Journal of veterinary diagnostic**  
3 **investigation**, v. 6, n. 4, p. 508-510, 1994.

4

1



2

3 **Figura. 1.** Mapa com a localização das propriedades onde foram coletados frangos  
4 do presente estudo.

**Tabela 1.** Análise dos resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, utilizando o teste Kappa entre os testes de RIFI (teste padrão ouro) e ELISA, para diagnóstico de *Neospora caninum* em frangos caipiras.

		RIFI			SE(%)	SP(%)	VPP (%)	VPN (%)	Kappa
		Positivo	Negativo	Total					
ELISA	Positivo	32	131	163	49,23	56,48	19,63	83,74	0,036
	Negativo	33	170	203					
	Total	65	301	366					

SE: Sensibilidade; SP: Especificidade; VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; Kappa: valor de acordo



**Tabela 2.** Quantidade de animais positivos no teste da RIFI e seus respectivos títulos.

<b>Título</b>	<b>Total</b>	<b>Porcentagem</b>
16	56	86,2%
64	8	12,3%
256	1	1,5%
1024	-	-
4096	-	-
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>100%</b>

**Tabela 3.** Total de animais coletados segregados por propriedades, contendo a quantidade de animais positivos e respectivos percentuais de positivos utilizando o teste da RIFI.

<b>Propriedades</b>	<b>Animais</b>	<b>Positivos</b>	<b>% Positivos</b>
1	10	0	0,00
2	63	6	9,52
3	22	0	0,00
4	9	0	0,00
5	46	6	13,04
6	3	0	0,00
7	7	4	57,14
8	19	6	31,58
9	18	8	44,44
10	3	1	33,33
11	6	1	16,67
12	15	3	20,00
13	22	5	22,73
14	10	2	20,00
15	8	4	50,00
16	8	3	37,50
17	37	3	8,11
18	2	0	0,00
19	3	0	0,00
20	12	3	25,00
21	14	1	7,14
22	11	2	18,18
23	8	5	62,50
24	5	2	40,00
25	5	0	0,00
<b>Total</b>	<b>366</b>	<b>65</b>	<b>100</b>

**Tabela 4.** - Animais positivos no teste de ELISA classificados de acordo com a densidade óptica, por Índices de ELISA crescendo a cada nível 35%.

<b>Índice de ELISA (IE) crescendo 35%</b>		<b>Total</b>	<b>%</b>	
<b>0</b>	0,00	0,274	203	55,5
<b>1</b>	0,275	0,371	16	4,4
<b>2</b>	0,372	0,502	20	5,5
<b>3</b>	0,503	0,679	28	7,7
<b>4</b>	0,68	0,918	31	8,5
<b>5</b>	0,919	1,241	26	7,1
<b>6</b>	1,242	1,677	14	3,8
<b>7</b>	1,678	2,265	13	3,5
<b>8</b>	2,266	3,059	6	1,6
<b>9</b>	≥ 3,060		9	2,5