

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Investigação de anticorpos para
Neospora caninum em humanos e sua relação com
a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana**

Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar Cunha

Pelotas, 2013

CÍNTIA LIDIANE GUIDOTTI AGUIAR CUNHA

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, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof.^a Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A282i Cunha, Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar
 Investigação de anticorpos para *Neospora caninum* em
 humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da
 Imunodeficiência Humana / Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar
 Cunha. – 42f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de
 Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração:
 Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Pelotas.
 Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2013. – Orientador Nara
 Amélia da Rosa Farias.

 1.Veterinária. 2.Parasitologia humana. 3.Protozoário.
 4.*Neospora caninum*. 5.Aids. 6. HIV. 7. Imunofluorescência.
 I.Farias, Nara Amélia da Rosa. II.Título.

CDD:

616.936

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Diego Moscarelli Pinto (UFPel)

Prof. Dr. Felipe Geraldo Pappen (IF/SC)

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela (UFPel)

Prof.^a Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias (UFPel)

À minha família pais, irmãos e esposo,
com carinho e gratidão.
DEDICO.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelas oportunidades que tive na vida.

Aos meus pais, Maria Inez e Altair, agradeço todo amor, carinho e pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Crístian, Juninho, e à minha cunhada Aline e sobrinha Lulu, pelo incentivo, carinho e momentos de descontração.

À minha orientadora, desde a Iniciação Científica, Prof.^a Dr.^a Nara Amélia da Rosa Farias por todos os anos de convívio, ensinamentos, compreensão, amizade, carinho, paciência e por acreditar neste trabalho, tornando-o possível.

Ao meu esposo Nilton, pelo carinho, amor, incentivo e companheirismo.

Aos amigos Plínio, Fernando e Jerônimo pelo apoio e amizade.

À Luciana Laitano por dividir as angústias e incertezas do mestrado.

À Graciela Xavier e Luciana dos Santos pela ajuda na execução deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Parasitologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.

Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso, aprendemos sempre.

Paulo Freire

Resumo

CUNHA, Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar. **Investigação de anticorpos para *Neospora caninum* em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imundeficiência Humana.** 2013. 42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, causador da neosporose e assemelha-se a *Toxoplasma gondii* pela formação de cistos teciduais em seus hospedeiros. Os humanos não são considerados hospedeiros intermediários para *N. caninum*, mas seu potencial zoonótico é discutível, em virtude da proximidade filogenética com *T. gondii* e do relato de um estudo, onde fetos de primatas não humanos, Rhesus, (*Macaca mulatta*) infectados artificialmente, apresentaram lesões semelhantes às causadas por toxoplasmose congênita. O presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em humanos e sua possível associação com a infecção por HIV e outros fatores de risco. A ocorrência de anticorpos para *N. caninum* foi determinada a partir de uma amostra de 156 pacientes HIV-positivos e 100 de indivíduos HIV-negativos do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com a diluição inicial de 1:25. Os títulos de anticorpos encontrados através da RIFI variaram entre 25 e 800. Das 256 amostras de soros humanos analisadas, 47 (18,3%) foram positivas para *N. caninum*. Sendo que anticorpos para esse coccídio foram encontrados em 36 pacientes HIV-positivos (23,1%) e em 11 indivíduos HIV-negativos (11%). A análise multivariada demonstrou que pacientes HIV-positivos que possuem contagem de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 células/mm³ possuem 2,4 vezes mais chances de serem soropositivos para *N. caninum*. Indivíduos HIV-negativos que apresentam soropositividade para *T. gondii* possuem 4,71 vezes mais chances de apresentarem anticorpos para o agente estudado. Os resultados obtidos indicam a exposição de seres humanos a *N. caninum*, com prevalência mais elevada em indivíduos imunocomprometidos.

Palavras-chave: AIDS. HIV. Imunofluorescência. *Neospora caninum*. Protozoário.

Abstract

CUNHA, Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar. **Investigação de anticorpos para *Neospora caninum* em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana.** 2013. 42f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan, causes neosporosis and resembles formation by *Toxoplasma gondii* tissue cysts in their hosts. Humans are not considered intermediate hosts for *N. caninum*, but its zoonotic potential is questionable, because of the close phylogenetic relationship with *T. gondii* and the report of a study, which fetuses of nonhuman primates, Rhesus, (*Macaca mulatta*) infected artificially with lesions similar to those caused by congenital toxoplasmosis. The present study aimed to verify the occurrence of antibodies to *N. caninum* in humans and its possible association with HIV infection and other risk factors. The presence of antibodies to *N. caninum* was determined from a sample of 156 HIV-positive patients and 100 HIV-negative individuals of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, through the reaction of Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), with initial dilution of 1:25. Antibody titers found by IFA ranged between 25 and 800. Samples of 256 human sera analyzed, 47 (18.3%) were positive for *N. caninum*. Since antibodies to this protozoan were found in 36 HIV-positive patients (23.1%) and in 11 HIV-negative individuals (11%). Multivariate analysis showed that HIV-positive patients who have CD4+ T-lymphocyte count ≤ 350 cells/mm³ have 2.4 times more likely to be seropositive for *N. caninum*. HIV-negative individuals who have seropositivity for *T. gondii* have 4.71 times more likely to have antibodies to the agent studied. The results indicate the exposure of humans to *N. caninum*, with higher prevalence in immunocompromised individuals.

Keywords: AIDS. HIV. Immunofluorescence. *Neospora caninum*. Protozoan.

Lista de Tabelas

ARTIGO	Investigação de anticorpos para <i>Neospora caninum</i> em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana	
Tabela 1	Caracterização da população de estudo (n= 256), segundo os possíveis fatores de risco para <i>N. caninum</i> em pacientes HIV-positivos e indivíduos HIV-negativos.....	33
Tabela 2	Prevalências de anticorpos para <i>N. caninum</i> , em pacientes HIV-positivos, relacionadas aos níveis de CD4+, uso de antirretroviral e sinal nervoso.....	34
Tabela 3	Título de anticorpos (RIFI) para <i>N. caninum</i> em humanos HIV-positivos (156) e saudáveis (100).....	35
Tabela 4	Frequência de anticorpos para <i>N. caninum</i> e sua associação com os possíveis fatores de risco em pacientes HIV-positivos (n=156), após a aplicação das análises univariada e multivariada.....	36
Tabela 5	Frequência de anticorpos para <i>N. caninum</i> e sua associação com os possíveis fatores de risco, em indivíduos HIV-negativos (n=100), após a aplicação das análises univariada e multivariada.....	37

Lista de Abreviaturas

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

CD4 – Agrupamento de Diferenciação 4

Céls – células

DNA – Deoxyribonucleic Acid

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IgG – Imonuglobulina G

mm³ – Milímetros cúbicos

nº – Número

RNA – Ribonucleic Acid

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIVcpz – Simian Immunodeficiency Virus in chimpanzees

SIVsmm – Simian Immunodeficiency Virus in soot mangabeys

UNAIDS – Joint United Nations Programme on HIV/AIDS

UFPEl – Universidade Federal de Pelotas

°C – Graus Celsius

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivos	16
3. Artigo	Investigação sorológica de anticorpos para <i>N. caninum</i> em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana.....	17
	Summary.....	18
	Resumo.....	18
	Introdução.....	19
	Material e Métodos.....	20
	Resultados.....	23
	Discussão.....	25
	Referências.....	29
4. Conclusão Geral	38
5. Referências	39

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla (1988) é um protozoário intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, agente causador da neosporose e que se assemelha ao *Toxoplasma gondii* pela formação de cistos teciduais em seus hospedeiros (DUBEY et al., 2002).

A neosporose foi primeiramente descrita por Bjerkas et al. (1984), na Noruega, em cães que apresentavam quadro neurológico e músculo esquelético alterado, sendo que anticorpos para *T. gondii* não foram encontrados nos soros destes cães e bradizoítos inoculados em camundongos não foram infectantes.

Posteriormente, Dubey et al. (1988), isolaram e descreveram um protozoário em cães que apresentavam sinais clínicos semelhantes aos relatados por Bjerkas, quando foi denominado *Neospora caninum*. Após esse coccídeo ser reconhecido como o causador de doenças em cães, formas semelhantes foram identificadas em fetos de bovinos abortados, mumificados e em terneiros com paralisia neonatal (MARSH et al., 1995).

Desde a sua descoberta até os dias de hoje, a neosporose é considerada uma das mais importantes enfermidades causadoras de abortamentos e perdas neonatais, tanto em bovinos leiteiros, quanto de corte (DUBEY e LINDASY, 1996; DUBEY et al., 2007).

Os canídeos domésticos (*Canis lupus familiaris*) atuam como hospedeiros definitivos, além dos coiotes (*C. latrans*), dingos (*C. lu. dingo*) e lobos cinza (*C. lupus*), nos quais ocorre a fase de desenvolvimento sexual do protozoário e a posterior eliminação de oocistos nas fezes (McALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011a). Mamíferos domésticos, como bovinos, caprinos, ovinos, equinos, além de outros silvestres como cervídeos, camelídeos e mustelídeos atuam como hospedeiros intermediários, sendo que nesses há a formação de cistos em seus tecidos, principalmente sistema nervoso central (DUBEY e LINDSAY, 1996; GONDIM, 2006). Dentre todos os hospedeiros, os canídeos, tanto domésticos, quanto silvestres atuam como hospedeiros definitivos e

intermediários, estando diretamente relacionados à epidemiologia da neosporose (DUBEY, 1988).

Atualmente, as áreas de transição ambiental, ecótonos, limites que separam os espaços urbanos de rurais estão, a cada dia passa, mais difíceis de serem identificados, devido à expansão das atividades humanas. Isso favorece o desequilíbrio de ambientes naturais e dessa forma, o contato com animais silvestres infectados por *N. caninum* pode ser inevitável, como os canídeos *Lycalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous* (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004), presentes em áreas de mata da região sul, do Rio Grande do Sul (RUAS et al., 2008).

A descoberta de hospedeiros em potencial de *N. caninum* tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Foi detectada a presença de DNA desse protozoário em tecidos renais, cérebro e músculo de camundongo doméstico (*Mus musculus*), rato-marrom (*Rattus norvegicus*) e rato do campo (*Apodemus sylvaticus*), o que sugere que estes animais podem atuar como reservatórios, uma vez que, possuem ampla distribuição e habitam tanto ambientes rurais, quanto urbanos (FERROGLIO et al., 2007). Quanto à eficiência de transmissão do parasito de roedores naturalmente infectados para outros animais, ainda não é conhecida, uma vez que parasitos viáveis não foram isolados. No entanto, sabe-se que ratos e camundongos são predados por diferentes espécies de carnívoros, inclusive canídeos, o que pode contribuir para a disseminação do parasito (GONDIM, 2008; DUBEY et al., 2011b).

De acordo com estudos realizados até 2007, apenas mamíferos haviam sido identificados como hospedeiros naturais para *N. caninum*, porém o coccídio foi detectado em galinhas (*Gallus gallus domesticus*), dado que poder vir a contribuir na epidemiologia da neosporose, uma vez que esses animais servem como fonte de alimento de várias outras espécies, no mundo inteiro (COSTA et al., 2008). Esse achado sugere que canídeos domésticos, possam se infectar ao se alimentarem de galinhas, usadas em rituais religiosos, deixadas às margens de vias urbanas e autoestradas. Anteriormente a esse relato, um estudo com cães que consumiram ovos de galinhas, embrionados, e infectados experimentalmente com *N. caninum*, eliminaram oocistos nas fezes, demonstrando a capacidade dessas aves em participar na transmissão do parasito (FURUTA et al., 2007).

Além da constatação da infecção natural por *N. caninum* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*), estudos evidenciam a presença do parasito em outras espécies de aves como pombas e pardais. Mineo et al. (2008), ao infectarem experimentalmente

pombas (*Columba livia*), com taquizoítos de *N. caninum*, e avaliarem a cinética da soroconversão de anticorpos, detectaram presença de IgG, em diferentes titulações. Gondim et al. (2010) identificaram a presença de DNA do parasito em coração e cérebro de pardais (*Passer domesticus*). Ambos os estudos sugerem a importância que aves podem ter como reservatórios naturais do coccídio.

Foi demonstrado por Cunha-Filho et al. (2008) que cães da área urbana são infectados por *N. caninum*, demonstrando que existe o risco de seres humanos entrarem em contato com o agente etiológico da neosporose, uma vez que a presença de oocistos viáveis nas fezes de canídeos naturalmente infectados podem ser uma fonte de infecção aos seres humanos, por sua ingestão em água contaminada, mãos sujas e vegetais mal higienizados. Além disso, existe a possibilidade de infecção pelo consumo de carne crua ou mal passada de hospedeiros intermediários, contendo cistos com bradizoítos.

De acordo com McCann et al. (2008), os seres humanos não são considerados hospedeiros intermediários para *N. caninum*. No entanto, o potencial zoonótico desse agente é discutível, em virtude da proximidade filogenética com *T. gondii* e do relato de um estudo realizado a partir da infecção experimental em fêmeas prenhes de primatas não humanos, Rhesus, (*Macaca mulatta*), ter sido capaz de causar nos fetos lesões semelhantes às causadas por toxoplasmose congênita (BARR et al., 1994; HEMPHILL et al., 1999).

Desde então, relatos da presença de anticorpos para *N. caninum*, em humanos, vem surgindo na literatura, a fim de preencher as lacunas referentes ao potencial zoonótico desse protozoário (TRANAS et al., 1999; LOBATO et al., 2006; BENETTI et al., 2009).

Na Califórnia, Tranas et al. (1999) detectaram a presença de anticorpos para *N. caninum* em 6,7% dos soros humanos analisados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Um estudo realizado por Lobato et al. (2006), indicaram a exposição ou a infecção de seres humanos por *N. caninum*, pois 38% dos pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e 18% dos pacientes que apresentavam distúrbios neurológicos foram soropositivos para esse agente. Os autores sugeriram que a neosporose pode vir a ser considerada uma parasitose oportunista em pacientes imunocomprometidos, além da infecção por *N. caninum* e *T. gondii* ocorrerem simultaneamente.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês HIV – *Human Immunodeficiency Virus*) foi descrito em 1983, como o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983), embora sua presença na população humana tenha sido registrada em 1981, quando sintomas de doença infecciosa rara e oportunista, foram observados em grupo de homens homossexuais e/ou usuários de drogas (GOTTLIEB, et al.; MASUR, et al., 1981).

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae* e ao gênero lentivírus, o qual é constituído por duas fitas de RNA não complementares e que se encontram associadas à enzima Transcriptase Reversa (TR), que irá transformar seu genoma de RNA, em uma cópia de DNA proviral e que se integrará aos cromossomos da célula hospedeira (SCHWARTZ e NAIR, 1999; GIRARD et al., 2011).

Estudos de análise filogenética permitem dividir o HIV em dois tipos HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o responsável pela pandemia, o qual está intimamente ligado a uma estirpe do vírus da imunodeficiência símia (SIVcpz) e identificado em membros nativos de chimpanzés da subespécie *Pan troglodytes troglodytes*, considerados reservatórios naturais do HIV-1 (KEELE et al., 2006). HIV-2 foi originado do SIVsmm que tem como hospedeiro natural o primata mangabey (*Cercocebus atys atys*) (SANTIAGO et al., 2005).

Desde sua identificação, a AIDS já vitimou cerca de 25 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se que 34 milhões estejam infectadas, o que torna essa enfermidade um problema e uma prioridade para os órgãos de saúde pública (UNAIDS, 2009, 2012). Já no Brasil, desde que os casos de AIDS passaram a ser notificados, 1980, cerca de 250 mil pessoas vieram a óbito e segundo estimativas do Ministério da Saúde, até 2012, 656.701, com idades entre 5-60 anos, foram infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A infecção pelo HIV-1 cursa com amplo espectro de apresentações clínicas, desde a fase aguda (que pode ser assintomática, oligossintomática ou se manifestar como síndrome retroviral aguda), até a fase avançada da doença, com as manifestações da imunodeficiência definida como AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Segundo Bacchetti e Moss (1989) a fase crônica se caracteriza por um longo período assintomático, onde a replicação viral mantém-se estabilizada, enquanto os níveis de linfócitos T-CD4+ diminuem lentamente. O tempo entre a soroconversão

até o desenvolvimento da AIDS é de, em média, dez anos, sendo que a progressão da doença está diretamente relacionada a níveis mais elevados de RNA do HIV e a consequente queda dos linfócitos T-CD4+ (BACCHETTI e MOSS, 1989; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O tratamento deve ser recomendado em indivíduos assintomáticos, com contagem de linfócitos T-CD4+ entre 200 e 350/mm³. Quanto mais próxima de 200 células/mm³ estiver a contagem de linfócitos T-CD4+, maior é o risco de progressão para AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Na França, Robert-Gangneux e Klein (2009), ao analisarem amostras de soros humanos de pacientes HIV-positivos e de mulheres grávidas saudáveis, constataram, através RIFI, a presença de anticorpos para *N. caninum* em 1% (4/400) dos pacientes HIV-positivos. No entanto, não foi constatada a ocorrência de anticorpos para esse parasito em amostras de soros de pessoas saudáveis.

Benetti et al. (2009) ao realizarem um estudo com trabalhadores rurais da região Sudoeste do estado de Mato Grosso, verificaram que, de 67 amostras de soros humanos analisadas pela RIFI, 10,5% apresentaram anticorpos contra *N. caninum*.

Devido a um possível papel desse parasito como causador de zoonose, estudos, principalmente, em grupos populacionais suscetíveis, como é o caso de pessoas imunocomprometidas, se tornam cada vez mais necessários, uma vez que, registros de soroprevalência nessa espécie vêm ocorrendo pelo mundo.

2. OBJETIVOS

Geral

* Verificar a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em humanos infectados e não infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana na região sul do Brasil.

Específicos

* Comparar a frequência de anticorpos para *N. caninum* entre as duas populações estudadas;

* Correlacionar os possíveis fatores de risco com a frequência de anticorpos em cada população;

3 ARTIGO

Título do artigo

Investigação sorológica de anticorpos para *Neospora caninum* em humanos e sua relação com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana

Autores

Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar Cunha

Nilton Azevedo da Cunha Filho

Fábio Pereira Leivas Leite

Luis Fernando Pita Gondim

Nara Amélia da Rosa Farias

**Manuscrito a ser submetido à Revista do Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo**

**INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS PARA *Neospora caninum*
EM HUMANOS E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

SUMMARY

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan, forming cysts belonging to the phylum Apicomplexa, which causes neosporosis. The present study aimed to verify the occurrence of antibodies to *N. caninum* in humans and its possible association with HIV infection and other risk factors. The presence of antibodies to *N. caninum* was determined from a sample of 156 HIV-positive patients and 100 HIV-negative individuals of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, through the reaction of Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), with initial dilution of 1: 25. Antibody titers found by IFA ranged between 25 and 800. Antibodies to *N. caninum* were found in 36 HIV-positive patients (23.1%) and in 11 HIV-negative individuals (11%). Multivariate analysis showed that HIV-positive patients who have CD4+ T-lymphocyte count \leq 350 cells/mm³ have 2.4 times more likely to be seropositive for *N. caninum*. HIV-negative individuals who have seropositivity to *Toxoplasma gondii* have 4.71 times more likely to have antibodies to the agent studied. The results indicate the exposure of humans to *N. caninum*, with higher prevalence in immunocompromised individuals.

KEYWORDS: AIDS; HIV; Immunofluorescence; *Neospora caninum*; Protozoan.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, formador de cistos, pertencente ao filo Apicomplexa, causador da neosporose. O presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em humanos e sua possível associação com a infecção por HIV e outros fatores de risco. A ocorrência de anticorpos para *N. caninum* foi determinada a partir de uma amostra de 156 de pacientes HIV-positivos e 100 de indivíduos HIV-negativos do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com a diluição inicial de 1:25. Os títulos de anticorpos encontrados através da RIFI

variaram entre 25 e 800. Anticorpos para *N. caninum* foram encontrados em 36 pacientes HIV-positivos (23,1%) e em 11 indivíduos HIV-negativos (11%). A análise multivariada demonstrou que pacientes HIV-positivos que possuem contagem de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 células/mm³ possuem 2,4 vezes mais chances de serem soropositivos para *N. caninum*. Indivíduos HIV-negativos que apresentam soropositividade para *Toxoplasma gondii* possuem 4,71 vezes mais chances de apresentarem anticorpos para o agente estudado. Os resultados obtidos indicam a exposição de seres humanos a *N. caninum*, com prevalência mais elevada em indivíduos imunocomprometidos.

PALAVRAS-CHAVE: AIDS; HIV; Imunofluorescência; *Neospora caninum*; Protozoário.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, formador de cistos, pertencente ao filo Apicomplexa, causador da doença conhecida por neosporose.¹²

O cão é considerado seu principal hospedeiro definitivo, podendo servir também de hospedeiro intermediário.²⁷ As demais espécies já identificadas como hospedeiros intermediários são ovinos, caprinos, equinos, bubalinos, além de vários animais silvestres como os cervídeos.^{16,21,39,15}

Três formas infectantes de *N. caninum* estão envolvidas na transmissão desse agente: bradizoítos (presentes no interior dos cistos), taquizoítos e oocistos esporulados.⁸ Os hospedeiros podem se infectar através da ingestão de tecidos contendo bradizoítos ou, ainda, pela ingestão de alimentos e água contaminada contendo oocistos esporulados.¹⁴

Os humanos não são considerados hospedeiros intermediários para *N. caninum*, porém, o potencial zoonótico desse parasito ainda é discutível, em virtude da proximidade filogenética com *T. gondii* e por compartilharem das mesmas formas de infecção.²⁰

Em experimento realizado com fêmeas prenhes de primatas não humanos, Rhesus, (*Macaca mulatta*), foi demonstrado que a inoculação de *N. caninum* é capaz de causar nos fetos lesões semelhantes às causadas por *T. gondii*.¹

Não existem evidências que *N. caninum* seja capaz de causar sintomatologia clínica em seres humanos com sucesso.²⁸ No entanto, alimentos frequentemente ingeridos pelos humanos, como o ovo, quando fornecidos com embrião infectado por *N. caninum* aos cães, os levam a eliminar oocistos nas fezes, sugerindo que galinhas infectadas possam desempenhar importante papel na epidemiologia da neosporose.¹⁷

N. caninum é considerado um protozoário oportunista, como já demonstrado em cães infectados por *Leishmania infantum* e em bovinos infectados por diarreia viral e herpesvírus 1.^{10,29} Devido à susceptibilidade a enfermidades.

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é uma doença de origem infecciosa, viral, letal, transmissível através de sangue e fluidos corporais humanos contaminados. Levando a perda progressiva da imunidade do portador, deixando-o predisposto as infecções oportunistas.¹⁹

Os pacientes HIV-positivos tornam-se suscetíveis a infecções concomitantes por agentes oportunistas, como pode ser o caso de *N. caninum*. O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em humanos HIV-positivos e indivíduos HIV-negativos e correlacionar a soropositividade para este parasito com possíveis fatores de risco.

MATERIAL E MÉTODOS

População e cálculo amostral

Foram analisada 256 amostras de soros humanos de indivíduos da região de Pelotas (RS), sendo 156 de pacientes HIV-positivos acompanhados no Serviço de Atendimento Especializado (SAE) e 100 de indivíduos HIV-negativos.

De acordo com informações fornecidas pelo SAE, cerca de 2.500 pessoas HIV-positivas são atendidas por esse serviço. Para o cálculo do tamanho amostral,

utilizou-se uma prevalência esperada de 50% (correspondente a enfermidades desconhecidas em determinada região), com erro esperado de 10%, e intervalo de confiança (IC) de 95%³⁷, chegando ao número mínimo de 92 amostras, sendo analisadas 156. A população estimada para o município de Pelotas, no ano de 2012, foi de 329.435 mil habitantes.²⁴ Para a amostragem de seres humanos saudáveis foi empregado o mesmo método de cálculo amostral, chegando ao número mínimo de 96 amostras, sendo analisadas 100. Os cálculos foram gerados através do programa estatístico Epi-Info versão 3.3.2.

Coleta e processamento das amostras

As coletas de sangue foram realizadas durante o ano de 2012 no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas e na residência de alguns participantes, por um profissional qualificado.

Essas amostras de soro ficaram armazenadas em freezer a -20°C, até o momento da prova sorológica, a qual foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel.

Às pessoas que concordaram em participar da pesquisa foi aplicado um questionário epidemiológico sobre possíveis fatores de risco para a infecção por *N. caninum*.

Aspectos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, e protocolado com o nº 21/12.

Variáveis epidemiológicas

Para a análise foram consideradas as seguintes variáveis epidemiológicas para ambos os grupos de estudo: sexo, faixa etária, escolaridade, hábito de manusear carne crua, hábito de consumir vegetais crus, consumo de carne crua ou mal cozida, consumo de embutidos caseiros, consumo de leite pasteurizado, consumo de água tratada, refeições realizadas em restaurantes, tem o hábito de

lavar as mãos antes das refeições, contato das mãos diretamente com o solo, histórico de transfusão sanguínea e ser soropositivo para *T. gondii*. No grupo dos HIV-positivos foram analisadas, ainda, as variáveis como contagem de linfócitos T-CD4+, uso de terapia antirretroviral (uso regular, irregular, sem necessidade de uso e necessita usar) e sinal nervoso.

Antígeno de *Neospora caninum*

Foram utilizadas lâminas sensibilizadas com taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-Bahia), as quais foram mantidas a -20°C até o momento das análises sorológicas.¹⁸

Análise sorológica

A soronegatividade para HIV entre os participantes, do grupo de humanos saudáveis, foi confirmada através de um teste rápido imunocromatográfico de passo único para determinação de HIV em soro (BioPix).

A presença de anticorpos para *N. caninum* foi detectada através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo técnica descrita por Björkman e Ugglå⁵, considerando-se positiva a amostra em que os taquizoítos apresentassem fluorescência periférica total.³² A diluição 1:25 foi utilizada como ponto de corte para a triagem inicial.

As amostras reativas foram testadas em diluições seriadas na base dois até a máxima titulação reagente.⁵

Análise estatística

Todas as variáveis foram categorizadas em dois estratos em escala crescente de risco. Dessa forma, a categoria com menor risco (zero) foi considerada como base para as demais categorias. A variável, contagem de linfócitos T-CD4+ foi estratificada, a partir de dados publicados sobre recomendações para terapia antirretroviral.³⁰

Primeiramente, foi realizada uma análise univariada, através do teste de Qui-quadrado (χ^2) e teste Exato de Fisher ($P \leq 0,25$), para verificar a possível associação

entre os fatores de risco e a variável dependente (positividade para *N. caninum*). Após, as variáveis independentes foram analisadas em modelo de regressão logística (análise multivariada). Para a análise da significância entre essas associações foi utilizada a *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%.²³ A análise foi feita com a utilização do software Statistix 9.0.³⁶

RESULTADOS

Caracterização da amostra

Foram realizadas análises sorológicas em 256 amostras de soros humanos de pessoas residentes na cidade de Pelotas, sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Dessas 156 (60,9%) eram de pacientes, HIV-positivos, atendidos pelo SAE e 100 (39,1%) de indivíduos HIV-negativos.

A tabela 1 demonstra a caracterização da amostra estudada em relação aos possíveis fatores de risco e a soropositividade para *N. caninum*.

Tabela 1

Entre os pacientes HIV-positivos 47,4 % possuíam níveis de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 céls/mm³ e 6,4% apresentaram algum tipo de sinal nervoso. No grupo que fazia uso de terapia antirretroviral, 91,0% usava regularmente e 9,0% usava com irregularidades. Já entre os pacientes que não faziam tratamento, 67,9% não necessitavam e 32,1% iriam passar a fazer uso da terapia.

Ocorrência de anticorpos para *N. caninum*

Das 256 amostras de soros humanos analisadas, 47 (18,3%) foram positivas para *N. caninum*.

A soropositividade para *N. caninum* foi de 23,1% (36/156) em pacientes HIV-positivos. Em indivíduos HIV-negativos foi de 11% (11/100), percentual estatisticamente inferior ao do grupo anterior ($P = 0,015$).

A frequência de anticorpos para *N. caninum*, em pacientes HIV-positivos com níveis de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 céls/mm³ foi de 31,1%. Em relação à presença de sinal nervoso (isquemias, toxo ocular, neurotoxoplasmose), a soropositividade foi de

30%. Quanto ao uso de terapia antirretroviral o percentual de soropositivos foi de 24,2%, 22,2%, 15,8% e 33,3% respectivamente de acordo com o uso regular, irregular, não uso e a necessidade de usar a terapia. Na tabela 2 encontram-se as prevalências de anticorpos para *N. caninum* relacionadas aos níveis de linfócitos T-CD4+, e ao tipo de uso de antirretrovirais.

Os títulos de anticorpos encontrados pela RIFI, nas amostras de soros avaliadas, variaram entre 25 e 800, sendo o título com maior frequência, nos dois grupos de estudo, o de 25, num total de 19 humanos (40,4%). O título de menor frequência foi o de 800, o qual foi detectado em apenas um humano, HIV-positivo (2,1%) (Tabela 3).

Tabela 2

Tabela 3

Fatores de Risco associados à soropositividade para *N. caninum*

Na análise univariada dos fatores de risco, para o grupo de pacientes HIV-positivos, as variáveis CD4, escolaridade, consumo de leite pasteurizado, sexo, histórico de transfusão sanguínea e ser soropositivo para *T. gondii*, apresentaram $P \leq 0,25$ e passaram a ser analisadas por um modelo multivariado de regressão logística. Nessa análise, foi constatado que pacientes HIV-positivos com níveis de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 céls/mm³, possuem 2,40 vezes mais chances de serem soropositivos para *N. caninum*.

Na Tabela 4 está demonstrada a associação entre os possíveis fatores de risco para *N. caninum* e a frequência de anticorpos em pacientes HIV-positivos (n=156), a partir das análises univariada e multivariada.

Tabela 4

Para o outro grupo estudado, indivíduos HIV-negativos, verificou-se através da análise univariada que, a soropositividade para *T. gondii*, escolaridade, faixa etária e refeições em restaurantes, podem estar relacionados à soropositividade para *N. caninum* ($P \leq 0,25$).

De acordo com o modelo de análise multivariada, os indivíduos HIV-negativos que apresentam soropositividade para *T. gondii* possuem 4,71 vezes mais chances de apresentarem anticorpos para *N. caninum*.

Na Tabela 5 estão expressas as frequências de anticorpos para *N. caninum* e a associação entre os possíveis fatores de risco em indivíduos HIV-negativos (n=100), após análises univariada e multivariada.

Tabela 5

DISCUSSÃO

Assim como já descrito em outras espécies animais, como cães, bovinos, primatas não humanos e galinhas,^{11,4,7,26} foi detectada a presença de anticorpos para *N. caninum* em humanos, o que reforça a ampla distribuição desse parasito e sugere hipóteses já verificadas por outros estudos, da circulação do agente entre seres humanos e especialmente entre HIV-positivos.^{38,25,34}

Esse é o primeiro relato da ocorrência de anticorpos para *N. caninum* em humanos no Rio Grande do Sul, Brasil. A alta soropositividade encontrada no presente estudo entre o grupo de pacientes HIV-positivos, em relação aos indivíduos HIV-negativos, foi detectada, também, por Lobato²⁵ em Minas Gerais, Brasil. Isso sugere a possibilidade de esses pacientes representarem um grupo de risco para a infecção por *N. caninum*, devido à particularidade da imunossupressão que podem favorecer outras infecções como *T. gondii* e também *N. caninum*.

O presente estudo detectou uma soroprevalência de 23,1% entre os pacientes HIV-positivos, dados que são inferiores aos encontrados por Lobato²⁵ que foi de 38% e superiores aos descrito por Robert-Gangneux e Klein³⁴ que detectaram uma soroprevalência de apenas 1%, usando a diluição 1:80, o que pode ter contribuído para essa baixa frequência de soropositivos. Em indivíduos HIV-negativos observou-se uma prevalência de 11%, sendo maior que a encontrada por Lobato²⁵ de 6,0%, e similar à detectada em moradores do meio rural, por Benetti,⁴ de 10,5%, ambos utilizaram a mesma técnica realizada no presente estudo para detecção de anticorpos. Apesar de serem indivíduos de ambientes distintos fica

demonstrada que as fontes de infecção encontradas tanto no meio rural, quanto no meio urbano podem ser as mesmas.

Pacientes HIV-positivos que apresentaram níveis de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 céls/mm³ apresentaram uma soropositividade para *N. caninum* de 31,1%. Nesses pacientes é indicada a terapia antirretroviral, e quanto mais próxima de 200 céls/mm³ estiver a contagem de linfócitos T-CD4+, maior é risco de infecções oportunistas³⁰ como *N. caninum*.

Petersen³³ ao não encontrarem indícios de contato com o agente causador da neosporose, em mulheres com histórico de aborto, sugeriu que estudos passassem a ser realizados com populações que apresentassem distúrbios neurológicos em virtude de os cães infectados por esse coccídio apresentarem sinais clínicos ligados ao sistema nervoso. Cunha-Filho¹¹, no entanto, em um levantamento sorológico para *N. caninum* em cães na mesma região do presente estudo, não encontrou essa relação entre soropositividade e presença de sinais neurológicos.

Quanto ao uso de terapia antirretroviral, foi observada soropositividade de 22,2% entre os pacientes que a fazem com irregularidades. Tal fato pode estar associado ao hábito que os usuários da terapia antirretroviral possuem de fazerem “férias” do tratamento, ou ainda fazer uso dessa terapia concomitantemente ao uso de álcool, o que pode acarretar prejuízos na adesão desse paciente ao tratamento.³⁰ É de fundamental importância que o paciente seja informado, de um dos principais objetivos da terapia antirretroviral, que é o de preservar e restaurar, quando possível, o sistema imunológico do paciente, por isso é fundamental que o mesmo evite irregularidades no tratamento.³⁰

O título de maior frequência encontrado pela técnica de RIFI, entre os indivíduos HIV-negativos foi o de 25 e o mais alto 50. Em trabalhos realizados com imunocompetentes, foram observados títulos similares⁴ ou superiores³⁸ aos encontrados no presente estudo.

Na França,³⁴ ao analisarem amostras de soros, através da RIFI, em humanos HIV-positivos, encontraram uma soroprevalência de 1% (4/400), para *N. caninum*, sendo o título mais frequente o de 80 e mais alto o de 160. No presente estudo, o título mais frequente foi o de 25 e mais alto o de 800. Não foi observada correlação

entre presença e valores dos títulos de anticorpos com sinais clínicos possíveis de serem relacionados à *N. caninum*, pois todos os humanos HIV-positivos amostrados apresentavam-se aparentemente saudáveis e a variável sinal nervoso não foi associada ao agente estudado. A presença do título alto (800) entre o grupo de HIV-positivos pode sugerir uma recrudescência da infecção, uma vez que em outras espécies já estudadas valores de títulos maiores ou iguais a 800 podem ser indicativos de infecção ativa.²

A análise multivariada demonstrou que os pacientes HIV-positivos possuem 2,40 vezes mais chances de serem soropositivos para *N. caninum* do que indivíduos HIV-negativos. Estudos demonstram que a progressão da AIDS para doenças oportunistas e a morte, está intimamente relacionada à contagem de linfócitos T-CD4+ inferiores a 350 céls/mm³; em contra partida a sobrevida está associada ao alto nível quantitativo plasmático dessas células.^{22,9} Desde o início da epidemia de AIDS, a contagem de linfócitos T-CD4+ tem sido utilizada como um parâmetro laboratorial preditivo do prognóstico da doença causada pelo HIV e também como um indicador do potencial risco para infecções oportunistas.⁶

Entre os indivíduos HIV-negativos, a análise multivariada, revelou que esses possuem 4,71 vezes mais chances de apresentarem anticorpos para *N. caninum*, ao serem soropositivos para *T. gondii*. Esse achado pode ser explicado devido à similaridade das formas de infecção entre *T. gondii* e *N. caninum*, principalmente, ingestão de oocistos esporulados e cistos teciduais. Além disso, os mesmos fatores de risco (hábitos alimentares) associados a *T. gondii*, podem também estar relacionados à *N. caninum*.

Neste trabalho, foi possível avaliar a possibilidade de reação cruzada entre os dois agentes, uma vez que os soros utilizados foram testados para *T. gondii*, por RIFI, por Xavier⁴⁰ e Santos³⁵. Constatou-se que indivíduos soropositivos para *T. gondii* não reagiram para *N. caninum*, ocorrendo também o contrário, ou seja, humanos soropositivos para *N. caninum* não apresentaram anticorpos para *T. gondii*. Isso exclui a hipótese de reação cruzada, embora possa haver exposição do mesmo indivíduo aos dois agentes, concomitantemente. Reações cruzadas não foram constatadas entre *T. gondii* e *N. caninum*, quando comparadas a RIFI de

ambos os parasitos, e ao serem analisados detalhes, das respostas sorológicas de bovinos, ovinos, caprinos, suínos, coelhos, ratos e camundongos à infecção experimental por *N. caninum*, foi verificada pouca ou nenhuma reatividade cruzada com *T. gondii* utilizando a RIFI.¹³

Muitas vezes, em busca de uma alimentação saudável, a população procura alimentos produzidos de forma sustentável, os quais podem se tornar uma fonte de infecção, uma vez que, em sua produção geralmente é utilizada adubação orgânica que pode conter oocistos esporulados, eliminados por cães, ou veiculados por aves, por terem acesso aos locais de produção desses adubos. A importância das aves e dos cães na epidemiologia da neosporose foi relatada em estudos de fatores de risco em rebanhos bovinos, demonstrando associação significativa entre essas variáveis e o aumento da soropositividade para *N. caninum*³¹, assim como abortamentos bovinos associados à presença de aves³, sendo essas consideradas vetores mecânicos de oocistos.

Os resultados deste estudo demonstram a exposição de humanos do sul do Brasil a *N. caninum*. Trata-se de um protozoário oportunista também em humanos, visto que pacientes HIV-positivos com baixos índices de linfócitos T-CD4+ são três vezes mais suscetíveis à infecção do que aqueles não infectados pelo vírus. Quando a doença é controlada (linfócitos T-CD4+ > 350) a chance de se infectar por *N. caninum* é reduzida à metade. A associação de fatores que facilitem a infecção humana por *T. gondii* também podem favorecer a infecção por *N. caninum*. Por isso, medidas profiláticas recomendadas para evitar a infecção humana, podem ser compartilhadas para ambos os protozoários.

REFERÊNCIAS

1 BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; TARANTAL, A.F.; HENDRICKX, A.G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**. v. 71, p.236-242, 1994.

2 BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Research**. v.139, p.439-443, 1996.

- 3 BARTELS, C. J. M.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortions storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**. v.52, p.247-257, 1999.
- 4 BENETTI, A.H.; SCHEIN, F.B.; SANTOS, T.R. dos; TONIOLLO, G.H.; COSTA, A.J. da; MINEO, J.R.; LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; GENNARI, S.M. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.18, supl.1, p.29-33, 2009.
- 5 BJÖRKMAN. C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal Parasitology**. v.29, p.1497-1507, 1999.
- 6 BORGES, I.K.; LIMA, J.E.; MILANEZ, P.A.O.; BERNARDES; S.S.; FELIPE, I.; COSTA, I.C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M.A.E. Participação de células T regulatórias (Tregs) na imunopatogênese da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). **Semina: ciências biológicas e da saúde**. v.31, p.169-178, 2010.
- 7 BOUER, A.; WERTHER, K.; MACHADO, R.Z.; NAKAGHI, A.C.H.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J.L. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and indirect ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.19, p.26-31, 2010.
- 8 BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.: The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**. v.18, p.546-552, 2002.
- 9 CHAISSON, R.E; KERULY, J.C; MOORE, R.D. Race, sex drug use, and progression of human immunodeficiency virus disease. **New England Journal of Medicine**. v.333, p.751-756, 1995.
- 10 CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**. v.106, p.307-313, 2002.
- 11 CUNHA-FILHO, N. A.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; RAGOZO, A. M. A.; GENNARI S.M.; LUCIA, T.; FARIAS, N.A.R. FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM CÃES URBANOS E RURAIS DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. v.17, p.301-306, 2008.
- 12 DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.192, p.1269-1285, 1988.

- 13 DUBEY, J.P. LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.67, p.1-59, 1996.
- 14 DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M.; Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, p.323-367, 2007.
- 15 DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; KWOK, O.C.H.; ZINK, R.L.; MICHALSKI, M.L.; ULRICH, V.; GILL, J.; CARSTENSEN, M.; THULLIEZ, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests. **Veterinary Parasitology**. v.161, p.330-334. 2009.
- 16 FIGLIUOLO, L.P.C.; RODRIGUES A.A.R.; VIANA, R.B., AGUIAR, D.M., KASAI, N., GENNARI, S.M.. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Res.** v.55, p.29-32, 2004.
- 17 FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.; CARRASCO, A.O.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**. v.134, p.1931-1939, 2007.
- 18 GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**. v.101, p.1-7, 2001.
- 19 GRANDO, L.J.; YURGEL, L.S.; MACHADO, D.C.; SILVA, C.L.; MENEZES, M.; PICOLLI, C. Manifestações estomatológicas, contagem de linfócitos T-CD4+ e carga viral de crianças brasileiras e norte-americanas infectadas pelo HIV. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. V.16, n.1, p.18-25, 2002.
- 20 HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v.29, p.1175-1188, 1999.
- 21 HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.O.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; BONESI, G.L.; HOWE, D.K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**. v.136, p.155-159, 2006.
- 22 HOGG, R.S; STRATHDEE, S.A.A.; CRAIB, K.J.; OSHANGHNESSY, M.V.; MONTNER, J.S.; SCHECHTER, M.T. Lower socioeconomic status and shorter survival following HIV infection. **The Lancet**. v.344, p.1120-1124, 1994.

- 23 HOSMER, D. W., LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression. New York: Wiley, 1989. p. 307.
- 24 IBGE. Censo Demográfico 2010 - Malha municipal digital do Brasil: situação em 2012. Rio de Janeiro: Instituto brasileiro de geografia e estatística, 2013.
- 25 LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.H.F.; SILVA SEGUNDO, G.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.13, n.1, p.84-89, 2006.
- 26 MARTINS, J; KWOK, O.C.H.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. **Veterinary Parasitology**. v.182, p.349-351, 2011.
- 27 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 of Parasitology**. v.28, p.1473-1478, 1998.
- 28 McCANN, C.M., VYSE, A.J., SALMON, R.L., THOMAS, D., WILLIAMS, D.J.L., McGARRY, J.W., PEBODY, R., TREES, A.J. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, p.978-980, 2008.
- 29 MELO C.B.; LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.19, p.97-105, 2004.
- 30 MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Recomendações para Terapia Antiretroviral em Adultos infectados pelo HIV, 2008. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/judicializacao/pdfs/491.pdf>. Acessado em: 26 de junho de 2013.
- 31 OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; REGALBONO, A. F.; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**. v.118, p.7-18, 2003.
- 32 PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v.7, p.273-275, 1995.

33 PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JENSEN, L.; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P. BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, p.278-280, 1999.

34 ROBERT-GANGNEUX, F.; KLEIN, FRÉDÉRIC. Serologic screening for *Neospora caninum*, France. **Emerging Infectious Diseases**. v.15, n.6, p. 987-988, 2009.

35 SANTOS, Luciana Siqueira Silveira dos. **Avaliação soroepidemiológica de *Toxoplasma gondii* em humanos e sua relação com o convívio com gatos (*Felis catus*) como animal de estimação**. 2012. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

36 STATISTIX®, Statistix 9.0 Analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.

37 THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*, second ed. Blackwell, Oxford, p. 483, 1995.

38 TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M.; McALLISTER, M.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.6, n.5, p. 765-767, 1999.

39 VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 36, p.1948-1951, 2006.

40 XAVIER, G.A.; CADEMARTORI, B.G.; CUNHA FILHO, N.A.; FARIAS, N.A.R. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in hiv/aids patients in the south of brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.55, p.25-30, 2013.

Tabela 1- Caracterização da população de estudo (n= 256), segundo os possíveis fatores de risco para *N. caninum* em pacientes HIV-positivos e indivíduos HIV-negativos.

Variáveis	Categorias	n	Frequência (%)
Sexo	Feminino	147	57,4
	Masculino	109	42,6
Faixa etária	14 - 30 anos	89	34,8
	≥ 31 anos	167	65,2
Escolaridade	< ensino médio	123	48,0
	≥ ensino médio	133	52,0
Manuseio de carne crua	Não	56	21,9
	Sim	200	78,1
Consumo de vegetais crus	Não	32	12,5
	Sim	224	87,5
Consumo de carne crua ou mal cozida	Não	178	69,5
	Sim	78	30,5
Consumo de embutidos caseiros	Não	139	54,3
	Sim	117	45,7
Consumo de leite pasteurizado	Não	46	18,0
	Sim	210	82,0
Consumo de água tratada	Não	77	30,1
	Sim	179	69,9
Refeições em restaurantes	Não	209	81,6
	Sim	47	18,4
Lavar as mãos antes das refeições	Não	240	93,8
	Sim	16	6,3
Contato das mãos diretamente no solo	Não	130	50,8
	Sim	126	49,2
Transfusão sanguínea	Não	219	85,5
	Sim	37	14,5
Soropositividade para <i>Toxoplasma gondii</i>	Não	91	35,5
	Sim	165	64,5

Tabela 2- Prevalências de anticorpos para *N. caninum*, em pacientes HIV-positivos, relacionadas aos níveis de CD4+, uso de antirretroviral e sinal nervoso.

Variável	Frequência	Sorodiagnóstico	
		Negativos %(n)	Positivos %(n)
Linfócitos T-CD4+			
CD4 > 350	52,6% (82/156)	84,2 (69)	15,8 (13)
CD4 ≤ 350	47,4% (74/156)	68,9 (51)	31,1 (23)
Uso de antirretroviral			
Regular	58,3% (91/156)	75,8 (69)	24,2 (22)
Irregular	5,8% (9/156)	77,8 (7)	22,2 (2)
Sem necessidade	24,4% (38/156)	84,2 (32)	15,8 (6)
Vão usar	11,5% (18/156)	66,7 (12)	33,3 (6)
Sinal nervoso			
Não	93,6% (146/156)	77,4 (113)	22,6 (33)
Sim	6,4% (10/156)	70 (7)	30 (3)

Tabela 3- Título de anticorpos (RIFI) para *N. caninum* em humanos HIV-positivos (156) e saudáveis (100).

Título de Anticorpos	Número de humanos soropositivos (%)		Total de positivos (%)
	Indivíduos HIV-negativos	Pacientes HIV-positivos	
25	7 (63,6)	12 (33,3)	19 (40,4)
50	4 (36,4)	8 (22,2)	12 (25,5)
100	0	10 (27,8)	10 (21,3)
200	0	5 (13,9)	5 (10,6)
400	0	0	0
800	0	1 (2,8)	1 (2,1)
Total	11 (11,0)	36 (23,1)	47 (100)

Tabela 4- Frequência de anticorpos para *N. caninum* e sua associação com os possíveis fatores de risco em pacientes HIV-positivos (n=156), após a aplicação das análises univariada e multivariada.

Variáveis	Amostras n (%)	Positivos (%)	Análise univariada		Análise multivariada	
			Odds Ratio (95% IC)	P	Odds Ratio (95% IC)	P
CD4						
>350	82 (52,6)	13 (15,8)	1		1	
≤ 350	74 (47,4)	23 (31,1)	2,40 (1,10 – 5,17)	0,02	2,40 (1,11 – 5,17)	0,03
Escolaridade						
≥ ensino médio	41 (26,3)	5 (12,2)	1			
< ensino médio	115 (73,7)	31 (26,9)	2,65 (0,95 – 7,38)	0,05		
Leite cru						
Não consome	127 (81,4)	26 (20,4)	1			
Consome	29 (18,6)	10 (34,4)	2,04 (0,84 – 4,92)	0,10		
Sexo						
Feminino	76 (48,7)	13 (17,1)	1			
Masculino	80 (51,3)	23 (28,7)	1,96 (0,91 – 4,22)	0,08		
<i>T. gondii</i>						
Negativo	21 (13,5)	3 (14,3)	1			
Positivo	135 (86,5)	33 (24,4)	1,94 (0,54 – 7,01)	0,23*		
Transf. Sanguínea						
Não	124 (79,5)	26 (20,9)	1			
Sim	32 (20,5)	10 (31,2)	1,71 (0,72 – 4,06)	0,22		

* Valor de P obtido pelo teste Exato de Fisher.

Tabela 5- Frequência de anticorpos para *N. caninum* e sua associação com os possíveis fatores de risco, em indivíduos HIV-negativos (n=100), após a aplicação das análises univariada e multivariada.

Variáveis	Amostras n (%)	Positivos (%)	Análise univariada		Análise multivariada	
			Odds Ratio (95% IC)	P	Odds Ratio (95% IC)	P
<i>T. gondii</i>						
Negativo	70 (70,0)	5 (7,1)	1		1	
Positivo	30 (30,0)	6 (20,0)	3,25	0,06*	4,71	
			(0,91 – 11,64)		(1,16 – 19,17)	0,03
Escolaridade						
≥ ensino médio	92 (92,0)	9 (9,8)	1			
< ensino médio	8 (8,0)	2 (25,0)	3,07	0,21*		
			(0,54 – 17,55)			
Faixa etária						
14 – 30 anos	43 (43,0)	3 (7,0)	1			
≥ 31 anos	57 (57,0)	8 (14,0)	2,18	0,21*		
			(0,54 – 8,75)			
Ref. Restaurantes						
Não	60 (60,0)	9 (15,0)	1			
Sim	40 (40,0)	2 (5,0)	0,30	0,10*		
			(0,06 – 1,46)			

* Valor de P obtido pelo teste Exato de Fisher.

4 CONCLUSÃO GERAL

*Os humanos amostrados no presente estudo tiveram contato com formas infectantes de *N. caninum*;

*A presença de fatores de risco associados a infecção humana por *T. gondii*, também favorece a infecção por *N. caninum*;

*Na espécie humana, a exemplo de outras já estudadas, *N. caninum* é um protozoário oportunista, visto que pacientes HIV-positivos com contagem de linfócitos T-CD4+ ≤ 350 são três vezes mais suscetíveis à infecção do que os não infectados pelo vírus. Quando a doença é controlada (linfócitos T-CD4+ > 350) a chance de se infectar por *N. caninum* é reduzida à metade.

*Medidas de profilaxia e sanitárias recomendadas para evitar a infecção humana por *T. gondii*, também podem ser direcionadas para *N. caninum*.

REFERÊNCIAS

BACCHETTI, P.; MOSS, A.R. Incubation period of AIDS in San Francisco. **Nature**, v.338, n.6212, p. 251-253, 1989.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; TARANTAL, A.F.; HENDRICKX, A.G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v.71, p.236-242, 1994.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER, C.; BRUN-VEZINET, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868- 870, 1983.

BENETTI, A.H.; SCHEIN, F.B.; SANTOS, T.R. dos; TONIOLLO, G.H.; COSTA, A.J. da; MINEO, J.R.; LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; GENNARI, S.M. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, supl.1, p.29-33, 2009.

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

CAÑON-FRANCO, W.A.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N A.R.; RUAS, J.L.; GÓMES, A.A.B; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two espécies of wild canidids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.3-4, p. 275-277, 2004.

COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZEDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.; ARAUJO, F. R.; MCALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.157-159, 2008.

CUNHA-FILHO, N. A.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; RAGOZO, A. M. A.; GENNARI S.M.; LUCIA, T.; FARIAS, N.A.R. FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* EM CÃES URBANOS E RURAIS DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v.17, p.301-306, 2008.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1-59, 1996.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOSTTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TRESS, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M.; Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinay Parasitology**, v. 181, p.382-387, 2011a.

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

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.346-349, 2007.

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.; CARRASCO, A.O.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v.134, p.1931-1939, 2007.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1175-1188, 1999.

GIRARD, M.P.; OSMANOV, S.; ASSOSSOU, O. M.; KIENY, M-P. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. **Vaccine**, v.29, p.61-6218, 2011.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v.22, p.247-252, 2006.

GONDIM, L.F.P. Novos desafios para o controle da neosporose. 2008. Disponível em:<http://cniia.inta.gov.ar/helmineto/Congreso%20Brasil%202008/NOVOS%20DESAFIOS%20CONTROLE%20NEOSPOROSE.pdf>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2012.

GONDIM, L.S.Q.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R.S.; SILVA, M.S.A.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.O.; GONDIM, L.F.P. *Toxoplasma gondii* and *Neospora*

caninum in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.121-124, 2010.

GOTTLIEB M.S.; SCHROFF R, SCHANKER HM, WEISMAN JD, FAN PT, WOLF RA, SAXON A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, v.305, p.1425-1431, 1981.

GRANDO, L.J.; YURGEL, L.S.; MACHADO, D.C.; SILVA, C.L.; MENEZES, M.; PICOLLI, C. Manifestações estomatológicas, contagem de linfócitos T-CD4+ e carga viral de crianças brasileiras e norte-americanas infectadas pelo HIV. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. V.16, n.1, p.18-25, 2002.

KING, J.S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D.J.; AL-QASSAB, S.E.; ELLIS, J.T., WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.945-950, 2010.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.H.F.; SILVA SEGUNDO, G.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of Immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.1, p.84-89, 2006.

MASUR, H.; MICHELIS, M.A.; GREENE, J.B.; ONORATO, I.; STOUWE, R.A.; HOLZMAN, R.S.; WORMSER, G.; BRETTMAN, L.; LANGE, M.; MURRAY, H.W.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v.305, p.1431-1438, 1981.

McCANN, C.M., VYSE, A.J., SALMON, R.L., THOMAS, D., WILLIAMS, D.J.L., McGARRY, J.W., PEBODY, R., TREES, A.J. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.978-980, 2008.

MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.149-153, 2008.

KEELE, B.F.; HEUVERSWYN, F.V.; LI, Y.; BAILES, E.; TAKEHISA J.; SANTIAGO, M.L.; BIBOLLET-RUCHE, F.; CHEN, Y.; WAIN, L.V.; LIEGEOIS, F.; LOUL, S.; NGOLE, E.M.; BIENVENUE, Y.; DELAPORTE, E.; BROOKFIELD, J.F.Y.; SHARP, P.M.; SHAW, G.M.; PEETERS, M.; HAHN, B.H. Chimpanzee reservoirs of Pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science**, v.313, p.523-526, 2006.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.; HO, M.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora caninum* to similar coccidial parasites. **Journal of Parasitology**, v.81, p.530-535, 1995.

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 of Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos infectados pelo HIV, 2008. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/judicializacao/pdfs/491.pdf>. Acessado em: 26 de junho de 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. Boletim epidemiológico Aids e DST-2012, 2012. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/52654/boletim_jorn_alistas_pdf_22172.pdf. Acessado em: 12 de fevereiro de 2013.

ROBERT-GANGNEUX, F.; KLEIN, FRÉDÉRIC. Serologic screening for *Neospora caninum*, France. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.6, p. 987-988, 2009.

RUAS, J.L.; MULLER, G.; FARIAS, N.A.R.; GALLINA, T.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G.; SINKOC, A.L.; BRUM, J.G.W. Helintos do cachorro do campo, *Pseudalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) e do cachorro do mato, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.2, p.87-92, 2008.

SANTIAGO, L.M.; RANGE, F.; KEELE, B.F.; LI, Y.; BAILES, E.; BIBOLLET-RUCHE, F.; FRUTEAU, C.; NOE, R.; PEETERS, M.; BROOKFIELD, J.F.Y.; SHAW, G.M.; SHARP, P.M.; HAHN, B.H. Simian Immunodeficiency Virus Infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the taï forest, côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic Human Immunodeficiency Virus type 2. **Journal of Virology**, v.79, n.19, p.12515-12527, 2005.

SCHWARTZ, S.A; NAIR, M.P. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.3, p.295-305, 1999.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M.; McALLISTER, M.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.5, p. 765-767, 1999.

UNAIDS. AIDS Epidemic Update, 2009. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/report/2009/jc1700_epi_update_2009_en.pdf. Acessado em: 26 de junho de 2013.

UNAIDS. Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012, 2012. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf. Acessado em: 25 de fevereiro de 2012.