

MARIA APARECIDA DE CARVALHO PATRÍCIO

**INVESTIGAÇÃO DE NEOSPOROSE EM ENCÉFALOS DE BOVINOS,
PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR),
COM QUADRO DE ENCEFALOPATIA E DIAGNÓSTICO NEGATIVO
PARA RAIVA, NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, para obtenção de título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosangela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2008

Dedico este trabalho

Aos meus pais **Getúlio** e **Ana Rosa** por terem me
dado o bem mais precioso – a **Vida**.

Aos meus grandes **Amores**:

Meu filho amado **Pedro** e meu esposo **Ivaldo**
pelo apoio incondicional e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Quando se pensa em agradecer, o que primeiro vem à nossa mente é não deixar ninguém no esquecimento, e não ser injusto.

À maior responsável por eu ter iniciado e desenvolvido este projeto, e em consequência disto, a inscrição neste curso - minha primeiramente Amiga, Professora Doutora e Orientadora **Rosangela Locatelli Dittrich**, por tudo que representou para mim como modelo de profissional, pelo incentivo e compreensão nos momentos que mais necessitei (por motivos pessoais e profissionais); também por sua confiança, seus ensinamentos, sua orientação que sempre serão motivo de orgulho. Nunca me esquecerei.

À minha amiga e colega, que ora é nossa Coordenadora no CDME **Mara Eliza Gasino Joineau** por seu profissionalismo, apoio, ensinamentos e além de tudo pelo grande incentivo para o desenvolvimento deste projeto.

À amiga **Marielza Pieper** pela ajuda (direta - teórica e prática) e pelo incentivo nos momentos de incertezas, meu muito obrigada!

Aos **médicos veterinários das unidades veterinárias da SEAB/Pr** que ao enviarem materiais em bom estado possibilitaram a realização deste estudo.

À amiga **Maria Ângela Teixeira** pelo apoio e auxílio no levantamento de informações técnicas.

Às amigas **Regina Célia Zonta de Carvalho** por suas orientações, dicas de suas experiências acadêmicas e preocupações para comigo, e **Rosária Richartz** pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de trabalho **Jurandir Cabral** e **Djalma Barbosa Neto** que me auxiliaram direta e indiretamente como no preparo de materiais e auxílio nos diagnósticos, com isto ajudando no desenvolvimento de minhas responsabilidades profissionais no Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”, e também no projeto.

Anna Lúcia Milleo e **Valquíria** que sempre prontamente auxiliaram com resgate de formulários já em arquivo morto, para o levantamento de informações sobre as amostras.

À **Universidade Federal do Paraná**, entidade que representa o ensino superior em minha vida, pois foi onde realizei os cursos de: graduação, especialização e mestrado; isto é, representa toda minha formação profissional.

Enfim a **todos os colegas e amigos** que de forma direta ou indireta estiveram ao meu lado dando apoio, incentivo e estímulo nas horas boas e difíceis, minha eterna gratidão.

Entre as grandes coisas
que não podemos fazer,
e as pequenas que não
fazemos, o perigo está
em não se fazer nenhuma.

(Autor desconhecido)

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

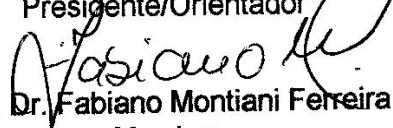
A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "INVESTIGAÇÃO DA NEOSPOROSE EM ENCÉFALOS DE BOVINOS, PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), COM QUADRO DE ENCEFALOPATIA E DIAGNÓSTICO NEGATIVO PARA RAIVA, NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL" apresentada pela Mestranda MARIA APARECIDA DE CARVALHO PATRÍCIO, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 22 de fevereiro de 2008.



Prof.^a Dr.^a Rosângela Locatelli Dittrich

Presidente/Orientador



Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira

Membro



Prof. Dr. Renato Andreotti e Silva

Membro

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1- HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO	19
1.2- BIOLOGIA DO <i>Neospora caninum</i>	20
1.3- MECANISMOS DE INFECÇÃO E PATOGENIA.....	23
1.4- SINAIS CLÍNICOS	24
1.5- JUSTIFICATIVA	26
REFERÊNCIAS	28
2. REVISÃO DE LITERATURA – DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA	35
RESUMO	35
ABSTRACT	35
2.1 - INTRODUÇÃO	36
2.2 - DIAGNOSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA.....	37
2.2.1 Métodos de diagnósticos sorológicos.....	39
2.2.1.1 Teste Imunoenzimático – ELISA.....	40
2.2.1.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	41
2.2.2 Diagnóstico parasitológico.....	42
2.2.2.1 Exame Histopatológico.....	42
2.2.2.2 Imunoistoquímica.....	43
2.2.2.3 Isolamento de <i>Neospora caninum</i>	44

2.2.2.4	Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	46
2.3	– CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	50
3.	PREVALÊNCIA DA RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE	
	2004 E 2006.....	58
	RESUMO.....	58
3.1	– INTRODUÇÃO.....	60
3.2	– MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.3	- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	66
4.	INVESTIGAÇÃO DE NEOSPOROSE EM ENCÉFALOS DE BOVINOS PELA	
	TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), COM QUADRO DE	
	ENCEFALOPATIA E DIAGNÓSTICO NEGATIVO PARA RAIVA, NO ESTADO DO	
	PARANÁ,	
	BRASIL.....	67
	RESUMO.....	67
	ABSTRACT.....	68
4.1	– INTRODUÇÃO.....	69
4.2	- MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.2.1	- ANIMAIS E AMOSTRAS.....	70
4.2.2	- CULTIVO CELULAR.....	71
4.2.3	- CULTIVO DOS TAQUIZOÍTAS DA CEPA NC-1 DE <i>Neospora caninum</i>	
	EM CÉLULAS VERO (in vitro).....	72
4.2.3.1	Descongelamento e produção de cepa NC-1 de <i>Neospora caninum</i>	
	73

4.2.3.2	Obtenção de parasitas para extração de DNA, visando o controle positivo da reação da polimerase em cadeia –PCR.....	74
4.2.4	-TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	75
4.2.4.1	Extração do DNA das amostras de encéfalo e do sedimento parasitário.....	76
4.2.4.2	Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	78
4.3	– RESULTADOS.....	81
4.4	- DISCUSSÃO	87
4.5	- CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
5.1	– PERSPECTIVAS.....	94
	ANEXOS.....	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESPECIFICAÇÕES DOS INICIADORES (SENSO E ANTI-SENSO) UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA IDENTIFICAÇÃO DO <i>Neospora caninum</i> (YAMAGE <i>et al.</i> , 1996)	75
TABELA 2 – REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DO MIX DE AMPLIFICAÇÃO PARA PCR DE FRAGMENTOS DE DNA DE <i>Neospora caninum</i> SUAS CONCENTRAÇÕES DE TRABALHO, CONCENTRAÇÕES POR REAÇÃO E SEUS RESPECTIVOS VOLUMES	79
TABELA 3 – NÚMERO DE AMOSTRAS PROCESSADAS E POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> EM CADA ANO, EM NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM.....	80
TABELA 4 – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> COM IDADE, RAÇA, MUNICÍPIO E PROTOCOLO DE ENTRADA NO CDME, NOS ANOS DE 2003-2006.....	82
TABELA 5 – NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> POR ANO E POR FAIXA ETÁRIA (MESES).....	84
TABELA 6 – ÍNDICE DE POSITIVIDADE DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD) PARA PESQUISA DE VÍRUS RÁBICO NOS DIVERSOS SEGMENTOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO <i>Neospora caninum</i> DESCRITO POR SCHARES, 2003.....	21
FIGURAS 2 e 3 – MAPAS DO ESTADO DO PARANÁ QUE APRESENTAM OS MUNICÍPIOS QUE TIVERAM AMOSTRAS PROCESSADAS (AMARELAS) E MUNICÍPIOS COM AMOSTRAS POSITIVAS (VERMELHO) PARA RAIVA NO PERÍODO ENTRE 2004 – 2006.....	64
FIGURA 4 – MAPAS DO ESTADO DO PARANÁ COM A DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS PROCESSADAS (AMARELAS) E DAS AMOSTRA POSITIVAS (VERMELHAS) PARA <i>Neospora caninum</i> (ENTRE 2003-2006).....	83
FIGURA 5 – GEL DE AGAROSE COM PRODUTOS DE PCR PARA <i>Neospora Caninum</i> DE ENCÉFALOS DE BOVINOS COM SINAIS NEUROLÓGICOS, UTILIZANDO INICIADORES Np6 E Np21 QUE PRODUZEM BANDAS AOS 328 PARES DE BASE.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – REPRESENTA A DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS PROCESSADAS (AMARELAS) E POSITIVAS (VERMELHAS) PARA DIAGNÓSTICO DE RAIVA NO PERÍODO ENTRE 2004 E 2006 PARA A ESPÉCIE BOVINA QUE FORAM ENVIADAS PARA O CDME.....	63
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> EM RELAÇÃO AO TOTAL GERAL DE AMOSTRAS PROCESSADAS NOS ANOS DE 2003-2006.....	81
GRÁFICOS 3, 4, 5 E 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS PROCESSADAS E POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> EM CADA ANO RESPECTIVAMENTE, EM PORCENTAGEM.....	81
GRÁFICO 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE BOVINO POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> POR ANO E POR FAIXA ETÁRIA.....	85
GRÁFICO 8 – DISTRIBUIÇÃO DO TOTAL DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Neospora caninum</i> POR FAIXA ETÁRIA.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg	Micrograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pM	Picomoles
ATCC	'American Type Culture Collection'
CDME	Centro de Diagnósticos " Marcos Enrietti"
DNA	Ácido desoxirribonucléico
IFD	Imunofluorescência direta
OIE	Organization International of Epizooties
PB	Prova biológica
pb	pares de bases
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SEAB	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VERO	células de rim de macaco verde africano

RESUMO GERAL

Nesta dissertação serão abordados os tópicos referentes ao *Neospora caninum*, sua biologia, sinais clínicos, uma revisão de literatura sobre o diagnóstico da neosporose bovina, uma demonstração de dados de prevalência da raiva dos bovinos no Estado do Paraná no mesmo período e percentual de amostras positivas e negativas para este diagnóstico o que desencadeou a realização desta pesquisa, e a investigação da neosporose em encéfalos de bovinos, pela técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR, com quadro de encefalopatia e diagnóstico negativo para raiva, no Estado do Paraná, seguidos pelas considerações finais.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário parasita que causa aborto e mortalidade neonatal, principalmente em bovinos, e doenças neuromusculares em cães. Este estudo objetivou determinar a presença do DNA do parasita em encéfalos de bovinos com sinais neurológicos. Foram avaliadas 253 amostras de encéfalos, sendo 161 de animais adultos e 92 de bezerros, procedentes de todas as regiões do Paraná e com diagnóstico negativo para raiva, pelas técnicas de imunofluorescência direta e prova biológica. As amostras coletadas continham fragmentos de medula oblonga, cerebelo e córtex (principalmente da região posterior do cérebro). Para o diagnóstico da neosporose, os encéfalos foram submetidos à técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os *iniciadores* Np6 e Np21. Foram detectadas 28 amostras positivas, representando uma prevalência de 11,07%. *Neospora caninum* foi detectado nos bovinos de corte e de leite, de todas as faixas etárias, e procedentes de todas as regiões do Paraná. Os resultados indicaram a presença do parasita nos bovinos adultos com sinais neurológicos, sugerindo que o diagnóstico da neosporose deva ser incluído nos casos de doenças neurológicas.

Palavra-chave: *Neospora caninum*, bovinos com sinais neurológicos, PCR.

ABSTRACT

Neospora caninum is a parasite protozoa that causes abortion and neonatal mortality, especially in cattle, and neuromuscular disease in dogs. The aim of this study was to determine the presence of the parasite's DNA in the encephalon of bovines with neurological signs. A total of 253 encephalon samples, 161 from adult animals and 92 from calf were evaluated. The samples, from all regions of Parana state, were negative for rabies with both the direct fluorescent antibody test and biological technique. The analyzed samples contained parts of the medulla oblongata, cerebellum and cortex (mainly from the posterior region of the brain). The samples were analyzed with the Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers Np6 and Np21 to diagnose neosporosis. A prevalence of 11,07% (28 samples) was found and *Neospora caninum* was identified in dairy and beef cattle, adults and calves, from all regions of Parana state. The results showed the presence of the parasite in adult cattle with neurological signs indicating the importance of including neosporosis in the differential diagnosis in cases of neurological diseases.

Key-words: *Neospora caninum*, bovine with neurological signs, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Há algum tempo vimos observando que muitos materiais que entravam para o diagnóstico de Raiva no Centro de Diagnósticos 'Marcos Enrietti' – CDME ficavam sem uma conclusão definitiva com relação à sua '*causa mortis*'; em sua maioria apresentavam históricos com sinais neurológicos. Esta dúvida persistia e dessa maneira realizou-se esta pesquisa com amostras que uma vez negativas para raiva foram arquivadas em freezer 80°C negativos; e posteriormente foi desenvolvido o diagnóstico para neosporose bovina, através da técnica de PCR.

A neosporose é uma doença que acomete bovinos entre outras espécies, causando abortamentos em bovinos de leite e de corte, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes (THURMOND & HIETALA, 1995). Também causa má-formação congênita em feto e em bezerro, como microcefalia, hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, anormalidades do sistema nervoso central (PARÉ *et al.*, 1996).

A elevada soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* observada em rebanhos bovinos com histórico de abortamento endêmico, o isolamento do parasita de fetos bovinos e de bezerros com sinais neurológicos e a presença de infecção congênita em bezerros clinicamente saudáveis, indicam que o diagnóstico da neosporose deveria ser incluído em rebanhos com histórico de abortamentos repetidos e de doenças neurológicas em bezerros (TREES *et al.*, 1999; ANDERSON *et al.*, 2000; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004).

A doença está amplamente disseminada nos diferentes continentes, na Europa, África do Sul, Ásia, Austrália e nas Américas (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

No Brasil, foi identificado pela primeira vez na Bahia (GONDIM *et al.*, 1999), e desde então tem sido notificado em diferentes Estados, indicando que a neosporose está difundida no país. Porém, não existem estudos determinando a prevalência do parasita em animais adultos e bezerros com sintomatologia nervosa.

A PCR é uma das técnicas mais importantes da biologia molecular e representa um grande avanço no diagnóstico de várias doenças, pela amplificação de segmentos específicos do DNA. O método utilizado para detectar o DNA de diversos patógenos, e durante os últimos anos vem se destacando como metodologia para pesquisa e diagnóstico de protozoários como *Toxoplasma* e *Neospora* (PITEL *et al.*, 2001); a utilização de diferentes técnicas de diagnóstico, como a PCR, aumenta a chance de detectar a infecção por *Neospora caninum* nos fetos (SAGER *et al.*, 2001).

A avaliação da neosporose como causa de doença neurológica em bovinos é fundamental para o conhecimento das demais conseqüências da doença no rebanho.

Os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- Cultivar o *Neospora caninum* (NC-1) para produção de taquizoítas como controle positivo na PCR;
- Investigar a presença de *Neospora caninum* nos cérebros de bovinos com quadro de encefalopatia, pela técnica de PCR;
- Estabelecer o diagnóstico como diferencial da Raiva e outras encefalopatias;
- Realizar uma avaliação epidemiológica do *Neospora caninum* no Estado do Paraná; e

- Divulgar os resultados para que os médicos veterinários de campo possam incluir a neosporose como mais uma doença de importante controle nas propriedades.

1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO

Em 1984, na Noruega, BJERKAS *et al.*, observaram um protozoário semelhante ao *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) em tecidos de cães. Porém, os animais não apresentaram anticorpos contra *T. gondii* na pesquisa sorológica. Os pesquisadores levantaram a hipótese de que um parasita imunologicamente distinto de *T. gondii* teria causado a morte dos cães (BJERKAS *et al.*, 1991).

DUBEY *et al.*, em 1988, revisaram os casos clínicos e os cortes histológicos de 23 cães com diagnóstico ou suspeita de toxoplasmose, examinados em um hospital veterinário em Boston, nos Estados Unidos, através de microscopia eletrônica de transmissão e técnicas imunohistoquímicas. Em treze destes cães foi identificado *T. gondii*, e em dez cães foi encontrado um novo parasita identificado então, como do gênero *Neospora* e a espécie *caninum*. Foi reconhecido como protozoário distinto de *T. gondii*, pois apresentava algumas diferenças estruturais e não reagia com o soro anti-*T. gondii* no teste de imunoperoxidase.

Em 1991, BJERKAS e DUBEY identificaram como *Neospora caninum* o parasita observado em tecidos de cães por BJERKAS *et al.* em 1984. Em 1988, a infecção por *N. caninum* em cães foi diagnosticada e isolou-se o protozoário em cultivo celular, camundongos e em cães inoculados com tecidos dos cães sabidamente infectados. As principais lesões observadas nos cães foram

meningoencefalomielite, miosite, poliradiculoneurite e encefalomielite (DUBEY *et al.*, 1988).

É morfologicamente similar a outros protozoários do filo Apicomplexa de importância em medicina veterinária como *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis sp.* (ANDERSON *et al.*, 2000; DUBEY, 2003).

1.2 BIOLOGIA DO *Neospora caninum*

O protozoário *Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório que foi isolado pela primeira vez de filhotes de cães com encefalomielite (DUBEY *et al.*, 1988). O parasita é reconhecido como a principal causa de abortamentos em bovinos, em todos os continentes, assim como de doença neuromuscular em cães (DUBEY, 2003).

Ele permanece nos bovinos durante várias gerações, como uma infecção crônica, sendo transmitida via transplacentária ao feto (BARR *et al.*, 1994; SCHARES *et al.*, 1998). A introdução do parasita no rebanho permaneceu sem explicações até a identificação dos oocistos nas fezes do cão e a descoberta do ciclo do protozoário (McALLISTER *et al.*, 1998). Na transmissão horizontal, os bovinos se infectam ingerindo o estágio de oocistos, eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (McALLISTER, 1999).

O *Neospora caninum* é um parasita que pertence ao filo Apicomplexa, a classe *Sporozoea*, ordem *Eucoccidiida* e família *Sarcocistidae*. Duas espécies são descritas no gênero *Neospora*, o *Neospora caninum* (DUBEY, 1988), isolado de cérebro de cão, e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998), isolado de cérebro e medula espinhal de equino.

Os hospedeiros intermediários de *Neospora caninum* são os cães, os bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, búfalos, cervos, ratos silvestres (*Rattus norvegicus*) e as raposas (*Vulpes vulpes*) (ANDERSON *et al.*, 2000; ALMERIA *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004). Os hospedeiros definitivos são os cães e os coiotes (McALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004); são os identificados até o momento, mas suspeita-se que outros canídeos silvestres possam também servir como hospedeiros definitivos e eliminar oocistos nas fezes (GONDIM *et al.*, 2004).

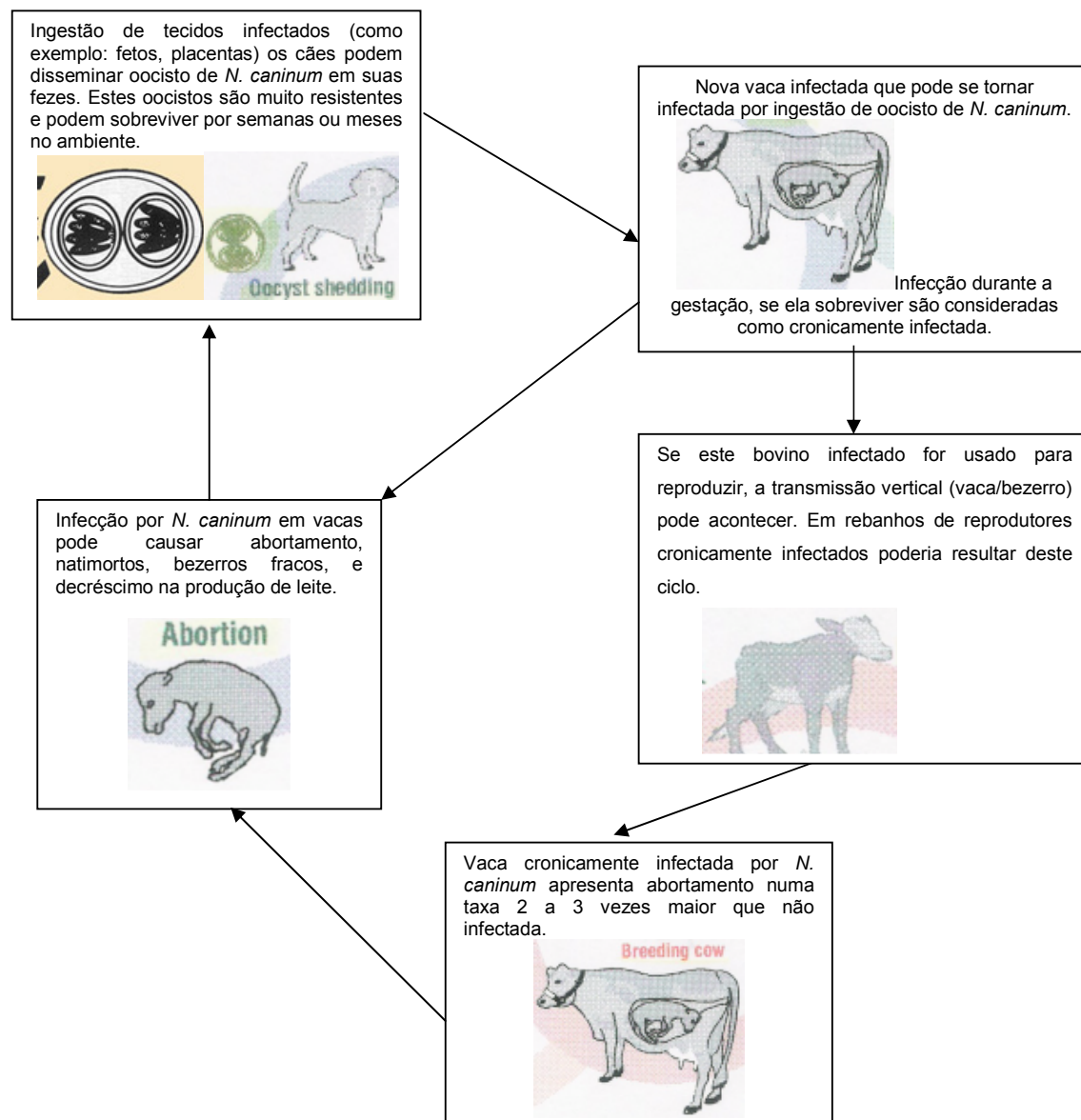
Os hospedeiros definitivos, quando ingerem os cistos de *Neospora caninum*, eliminam os oocistos não esporulados nas fezes. Os oocistos não esporulados apresentam um esporonte central e não são infectivos. No meio ambiente ocorre a esporulação, formando-se dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítas. Os oocistos de *Neospora caninum* são morfologicamente similares aos oocistos de *Hammondia heydorni* encontrados nas fezes de cães, e *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi* encontrados nas fezes de gatos (SCHARES *et al.*, 2002; DUBEY, 2003). A identificação dos oocistos de *Neospora caninum* nas fezes do cão, hospedeiro definitivo, e a descoberta do ciclo do protozoário (figura 1) permitiram descrever a via horizontal de transmissão do parasita (McALLISTER, 1999).

As formas identificadas do ciclo de vida do *Neospora caninum* são os taquizoítas (organismos proliferativos), os cistos com os bradizoítas (organismos de multiplicação lenta) e os oocistos (DUBEY *et al.*, 1988; McALLISTER *et al.*, 1999), eliminados nas fezes do cão ou coioite, hospedeiros definitivos do parasita (McALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004).

Os taquizoítas são ovóides, redondos ou em forma de meia-lua, com o núcleo em posição central ou terminal. Nos animais infectados os taquizoítas de *Neospora*

caninum foram observados em células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (DUBEY *et al.*, 1988). Nos bovinos, os taquizoítas foram observados no cérebro, coração, fígado e pulmões de fetos; na placenta e na medula espinhal de bezerros (DUBEY, 1999). Os parasitas destroem as células nervosas do sistema nervoso central e dos nervos periféricos, alterando a condutividade das células afetadas. (DUBEY & LINDSAY, 1993).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Neospora caninum* descrito por SCHARES, 2003.



Os bradizoítas localizam-se em grande número dentro do cisto tecidual (DUBEY *et al.*, 1988). O início da resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos provavelmente induzam a entrada dos taquizoítas nas células e a diferenciação em bradizoítas, estabelecendo a infecção pela presença dos cistos (PETERS *et al.*, 2001).

Os cistos estão localizados principalmente no sistema nervoso central e retina, sendo também observados no músculo esquelético de cães e bezerros. Os cistos podem persistir no hospedeiro infectado por vários anos, sem causar nenhuma manifestação clínica (PETERS *et al.*, 2001).

No Brasil, o protozoário *Neospora caninum* foi isolado de cão na Bahia (GONDIM *et al.*, 2001); de feto bovino e de bezerro com cegueira congênita no Paraná (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; 2004); de búfalo em São Paulo (RODRIGUES *et al.*, 2004) e de ovino em São Paulo (PENA *et al.*, 2007).

1.3 MECANISMOS DE INFECÇÃO E PATOGENIA

Nos bovinos, como está demonstrado na figura 1, os dois mecanismos de infecção por *Neospora caninum* são a transferência do parasita da mãe para o feto (transmissão vertical ou infecção congênita) e a ingestão de oocistos esporulados (transmissão horizontal ou infecção pós-natal) (McALLISTER & LATHAM, 2002).

Até a descoberta dos oocistos nas fezes de cães, a introdução do parasita no rebanho permanecia sem explicação (McALLISTER & LATHAM, 2002).

O *Neospora caninum* encista-se no tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo, nervos), na retina e no músculo esquelético. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro. Nos bezerros com neosporose congênita, os

cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal. Os bradizoítas dos cistos são resistentes à solução de pepsina ácida e são infectantes por via oral para camundongos, gatos e cães, indicando que o hábito dos carnívoros é uma via de infecção de *Neospora caninum* (LINDSAY & DUBEY, 1990).

1.4 SINAIS CLÍNICOS

A neosporose causa abortamento em bovinos de leite e de corte, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes. As vacas de todas as idades podem abortar, dos três meses de gestação até a termo, porém, a maioria dos abortamentos ocorre entre o quinto e sexto mês de gestação. Os fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, nascerem mortos, nascerem vivos com sinais clínicos, nascerem vivos e clinicamente normais, mas infectados (THURMOND *et al.*, 1995). A probabilidade de abortamento é maior nas vacas com anticorpos anti *Neospora caninum*, do que nas vacas soronegativas (THURMOND e HIETALA, 1997; MOEN *et al.*, 1998).

Uma elevada porcentagem, de 80 a 90%, dos bezerros que nascem de vacas soropositivas foi infectada via congênita, baseada no diagnóstico sorológico, e mantém a infecção no rebanho. Os animais que nascem sem sinais clínicos são portadores do parasita e reservatórios potenciais no rebanho (LINDSAY & DUBEY, 1990).

Os abortamentos devido a neosporose podem ser endêmicos ou epidêmicos. Nos rebanhos bovinos com abortamentos endêmicos atribuídos a neosporose, geralmente há uma associação positiva entre o estado sorológico da mãe e das filhas, ou seja, existem evidências que a principal via de transmissão nestes

rebanhos é a vertical (THURMOND & HIETALA, 1997; SCHARES *et al.*, 2002). A recrudescência de uma infecção latente durante a gestação pode aumentar o risco de abortamento (GUY *et al.*, 2001). Nos casos de abortamentos epidêmicos causados por *Neospora caninum*, provavelmente as vacas se infectaram via horizontal, por ingestão de água ou alimento contaminados por oocistos (SCHARES *et al.*, 2002; SAGER *et al.*, 2005).

Os outros sinais clínicos, além dos abortamentos, foram relatados em bezerros com menos de quatro meses de idade. A infecção fetal por *Neospora caninum* pode causar anormalidades no sistema nervoso dos bezerros, caracterizando a neosporose clínica (VIANNA, 2004). Nos bezerros infectados via congênita e nascidos vivos, a doença afeta principalmente o sistema nervoso central (SNC), e os sinais clínicos aparecem geralmente dentro de três a cinco dias, ou até duas semanas após o nascimento (WOUDA, 2000). Os sinais neurológicos podem ser deformações nos membros, como flexão, ou hiperextensão dos membros torácicos e/ou pélvicos, ataxia, diminuição dos reflexos patelares, perda da consciência próprio-receptiva dos membros, paralisia, opistótono e incoordenação, exoftalmia ou aparência assimétrica dos olhos, cegueira, deformações associadas com lesões das células nervosas embrionárias (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; De MEERSCHMAN *et al.*, 2005).

O *Neospora caninum* também causa má-formação congênita em feto e em bezerro, como microencefalia, hidroencefalia, hipoplasia cerebelar, anormalidades do sistema nervoso central (PARÉ *et al.*, 1996). A encefalomielite é a lesão predominante na neosporose clínica e a degeneração muscular causando miosite e deformações nos membros. As anormalidades clínicas podem regredir, permanecerem estáticas ou mesmo progredir. Os bezerros podem nascer com o

peso abaixo do normal, com diminuição da massa muscular, fracos, com dispnéia, e incapacidade de se levantar (WOUDA, 2000).

1.5 JUSTIFICATIVA

No Paraná, existe um grande número de casos de óbitos em bovinos com sinais neurológicos, sem um diagnóstico definitivo e/ou conclusivo, descrito no capítulo 4 desta dissertação. A neosporose ainda não é incluída como uma das possíveis causas de doença neurológica, como um diagnóstico diferencial, sendo até o momento realizados apenas:

- Pesquisa para identificação de **Encefalite Espongiforme dos Bovinos (BSE – Vaca Louca)** que faz parte de um Programa Nacional, coordenado pelo Ministério da Agricultura, em que animais com mais de 24 meses de idade com sinais neurológicos ou importados têm obrigatoriedade de coleta de material também em formol, que eram na região sul até outubro de 2007, encaminhados para a Universidade de Santa Maria (na pessoa do Professor Doutor Cláudio Barros) e realizado exame pela técnica de cortes histológicos, e ora serão enviados para o LANAGRO/PE em Recife; e abaixo de 24 meses de idade é processado no CDME no laboratório de histopatologia;
- Isolamento viral em cultivo celular sensível para **Herpesvírus** realizado no CDME;

Em alguns casos, isolamento e caracterização para **Listeriose**, nos camundongos utilizados para a técnica de inoculação intracerebral (Prova biológica) para raiva apresentam sinais evidentes desta doença como cegueira unilateral e

pêlos arrepiados nos primeiros dias pós-inoculação são encaminhados para a área da bacteriologia no CDME.

Desta forma foi proposta esta pesquisa levando em consideração a escassez de informações sobre a neosporose como agente causador de doença neurológica em bovinos e a quantidade de material processado para exame de raiva com resultado negativo, como descrito no item 4 desta dissertação, e que permanece sem um diagnóstico conclusivo.

A perspectiva de resolução destes casos e a de suprir a lacuna com relação ao diagnóstico para os médicos veterinários e proprietários de bovinos definindo-se a causa do quadro neurológico, as características operacionais do método de PCR para neosporose, a metodologia e adequação desta técnica de diagnóstico foram alguns dos objetivos deste estudo.

REFERÊNCIAS

ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PAVÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S.; Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediated host of *Neospora caninum* . **Veterinary Parasitology**, n. 107, p. 287-294. 2002.

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61; p. 417-431. 2000.

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, T.V.; PAIVA, F. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. Campo Grande. **Embrapa Gado de Corte**, 51 p.; ISSN 1517-3747. 2003.

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

BJERKAS, J.; DUBEY, J. P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 32, p. 407-410. 1991.

BJERKAS, J.; DUBEY, J. P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 32, p. 407-410. 1991.

De MEERSCHMAN, F., FOCANT, C., DETRY, J., RETTINGNER, C., CASART, D., LOSSON, B., Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. **Veterinary Record**. n. 157; p. 115-118. 2005.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367. 1999.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, C. A.; SPEER, M. J.; TOPPER & 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. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v. 41; n. 1; p. 1-16. 2003.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, n.12, p. 452-458. 1993.

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 n. 02; p. 159-161. 2004.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESÚS, E. E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNÁNDEZ, H.S.; ALMEIDA, M.AO; 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, n. 1, p. 1-7. 2001.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO Jr., L. A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 35. 1999.

GUY, C.S.; WILLIAMS, D.J.L.; KELLY, D.F.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; BJÖRKMAN, C.; SMITH, R.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **Veterinary Record**, n. 149, p. 443-449. 2001.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H. K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, p. 283-290. 2004.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 410-413, 1990.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.B.T.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, n. 153, p. 366-367. 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Isolation de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109. 2004.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 530-535. 1998.

McALLISTER, D.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 4-5, 2002.

McALLISTER, M. M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitology Today**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 216-217, 1999.

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.

MOEN, A. R., WOUDA, W., MUL, M. F., GRAAT, E. A. M, van WERVEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**. n. 49; p. 1301-1309. 1998.

PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* Infection In Dairy Cattle and Associated CalfhooD Mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**. n. 60, p. 133-139, 1996.

PETERS, M., LÜTKEFELS, E., HECKEROTH, A. R., SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal Parasitology**. v. 31; p. 1144-1148. 2001.

PITEL, P. H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLEt, J. J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* in cattle and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 4, p. 269-277. 2001.

RODRIGUES, A. A. R., GENNARI, S. M., AGUIAR, D. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., VIANNA, M. C. B., DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**. V. 124; p. 139-150. 2004.

SAGER, H., HÜSSY, D., KUFFER, A., SCHREVE, F., GOTTSTEIN, B. Mise en evidence d'un de "abortion strom" (transmission transplacentaire exogène de *Neospora caninum*) dans une exploitation de vaches laitières: une première en Suisse. **Archives Tierheilkd**. n. 147; p. 113-120. 2005.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum* – associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**. v. 102; Issues 1-2; p. 1-15. 2001.

SCHARES, G.; BÄRWALD, A.; STAUBACH, C.; SÖNDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHÖDER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**, v.106, p. 293-305. 2002.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-98. 1998.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**. n. 58, p. 1381-1385. 1997.

THURMOND, M., HIETALA, S., Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practical**. n. 29; p. 60-63. 1995.

TREES, A.J.; DAVIDSON, H.C.; INNES, E.A.; WADTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v.29, p. 1195-1200. 1999.

VIANNA, L.C. Ocorrência e transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em novilhas prenhes. 2004. 52 fl. **Tese** (doutorado) em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2004.

WOUDA, W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis. **Veterinary Quarterly**, v.22, p. 71-74. 2000.

2. REVISÃO DE LITERATURA – DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA

RESUMO

A neosporose é causada pelo protozoário parasita *Neospora caninum*. A doença é considerada a principal causa de abortamentos em bovinos. Os relatos da ocorrência de neosporose aumentaram muito durante a última década em vários países, inclusive no Brasil. O diagnóstico da neosporose associado aos casos de abortamento e mortalidade neonatal é difícil. Esta revisão aborda as diferentes técnicas de diagnóstico da neosporose bovina, descrevendo os métodos sorológicos e parasitológicos, suas aplicações e perspectivas.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, Neosporose, diagnóstico, bovinos.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Neospora caninum* is a major cause of abortion in cattle. Neosporosis has emerged as a serious disease in cattle worldwide, included Brazil. The diagnosis of neosporosis - associated mortality and abortion is difficult. This paper reviews information on clinical signs, and methods of diagnosis of bovine neosporosis, relating serologic and parasitologic methods and their applications and perspectives.

Key Words: *Neospora caninum*, Neosporosis, diagnosis, cattle.

2.1 INTRODUÇÃO

O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, a ocorrência de abortos e o nascimento de bezerros natimortos são sinais sugestivos de infecção por *N. caninum*. Os sinais clínicos devem ser considerados na suspeita clínica de neosporose, porém, os exames laboratoriais são necessários para a confirmação do diagnóstico (ANDERSON *et al.*, 2000).

No diagnóstico da neosporose é importante demonstrar o *Neospora caninum* nas lesões e excluir outras causas de abortamento (WOUDA *et al.*, 1997). Se as lesões no cérebro e coração forem muito severas, com a detecção dos taquizoítas do parasita, a causa provável do abortamento é o *Neospora caninum* (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Nos casos em que o exame do feto não é realizado, as lesões histopatológicas no feto estão ausentes ou são poucas, porém, existem evidências da infecção por sorologia materna/fetal ou por PCR positiva, é importante examinar o problema do aborto dentro do grupo de animais com risco de abortamento (THURMOND & HIETALA, 1999).

A encefalomielite é a principal lesão observada nos bezerros nascidos vivos, mas clinicamente afetados (ANDERSON *et al.*, 2000).

As técnicas laboratoriais de diagnóstico da neosporose bovina são fundamentais para a confirmação da doença e também para se realizar o controle sanitário, direcionar e adequar as medidas de prevenção para o rebanho (PFALLER, 2001; JENKINS *et al.*, 2002).

Esta revisão aborda os métodos de diagnóstico da doença, sorológicos, histopatológico, imunoistoquímico e a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.2 DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE BOVINA

No diagnóstico da neosporose é importante demonstrar o *Neospora caninum* nas lesões e excluir outras causas de abortamento (WOUDA *et al.*, 1997). Se os exames do soro materno, líquidos ou tecidos fetais resultarem positivos para *Neospora caninum*, por sorologia ou PCR, o abortamento pode ser associado a neosporose. Se as lesões no cérebro e coração forem muito severas, com a detecção dos taquizoítas do parasita, a causa provável do abortamento é o *Neospora caninum* (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Nos casos em que o exame do feto não é realizado, as lesões histopatológicas no feto estão ausentes ou são poucas, porém, existem evidências da infecção por sorologia materna/fetal ou por PCR positiva, é importante examinar o problema do aborto dentro do grupo de animais com risco de abortamento (THURMOND & HIETALA, 1995).

Os sinais clínicos devem ser considerados na suspeita clínica de neosporose, porém, os exames laboratoriais são necessários para a confirmação do diagnóstico. O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, a ocorrência de abortos e o nascimento de bezerros natimortos são sinais sugestivos de infecção por *N. caninum* (ANDERSON *et al.*, 2000).

As lesões causadas por *N. caninum* no cérebro e coração dos fetos podem ser severas o suficiente para matar o feto. A soroprevalência de *Neospora caninum* pode ser de até 100% em alguns rebanhos leiteiros e a transmissão do parasita da mãe para o feto é muito eficiente. Isto dificulta o diagnóstico da neosporose como causa do aborto, porque uma infecção pelo parasita pode ser observada no feto ou sua mãe mesmo quando o protozoário não causou o aborto (ANDERSON *et al.*, 2000).

Os métodos indiretos ou sorológicos e os diretos ou parasitológicos são utilizados para o diagnóstico da neosporose bovina. O sorodiagnóstico é mais indicado para avaliar a exposição e o risco de infecção pelo *Neospora caninum* em um rebanho, do que para o diagnóstico de abortamento. Os métodos sorológicos são o teste imunoenzimático – ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) e a reação da imunofluorescência indireta (RIFI). Os métodos diretos são os exames histopatológico, imunohistoquímico e a reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de isolamento do parasita, *in vivo* ou *in vitro*, não é considerada um método de diagnóstico de rotina, mas será abordada nesta revisão.

O diagnóstico de abortamento associado a *Neospora caninum* é feito geralmente pelos exames histopatológico e imunohistoquímico dos tecidos fetais. A utilização de diferentes técnicas diagnósticas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), aumenta a chance de detectar a infecção por *Neospora caninum* (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003).

2.2.1 Métodos de diagnóstico sorológicos

Os métodos sorológicos disponíveis no mercado, para detectar anticorpos anti-*Neospora caninum*, utilizam como antígenos os taquizoítas (ANDERSON *et al.*, 2000). Os testes com antígenos de bradizoítas ou esporozoítas não estão disponíveis (DUBEY & SCHARES, 2006). A sorologia é utilizada como método diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortamentos por *Neospora caninum* e para fornecer informações sobre o estágio de infecção. Em bezerros ou bovinos adultos, os anticorpos específicos IgM e IgG aparecem no sangue poucos dias após infecção primária. O pico máximo dos níveis de IgM ocorre duas semanas após a infecção e os níveis de IgG aumentam durante a primeira semana até três a seis meses após a infecção experimental primária (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Todos os testes sorológicos, no entanto, devem ser interpretados com precaução, porque o sistema imune não é estático e os níveis de anticorpos flutuam, principalmente para os parasitas que formam cistos teciduais e podem recrudescer com uma imunossupressão (WALDNER *et al.*, 1998). Nos bovinos os níveis de anticorpos anti *Neospora caninum* flutuam durante o período de gestação e em alguns casos podem diminuir abaixo do limite de detecção (CONRAD *et al.*, 1993).

Após a vacinação dos bovinos com a vacina inativada de *Neospora caninum*, a interpretação dos resultados sorológicos torna-se difícil. Os animais vacinados produzem resposta por anticorpos similar aos bovinos com infecção natural (MOORE *et al.*, 2005).

Vários testes estão disponíveis para detectar anticorpos contra *Neospora caninum*. No entanto, um problema com os testes sorológicos para *Neospora caninum* é que a maioria dos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico desenvolve

seu próprio método e determinam os pontos de corte a serem utilizados para interpretação dos resultados. A comparação entre títulos ou valores de absorvância obtidos entre os diferentes laboratórios não é possível (BJORKMAN & UGGLA, 1999).

O diagnóstico de abortamento por *Neospora caninum* não deve ser baseado somente no método sorológico (SAGER *et al.*, 2001; PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003). O resultado sorológico positivo em um bovino com histórico de abortamento indica somente que ocorreu exposição do animal ao parasita, sendo necessário demonstrar o protozoário no feto e, se possível, incluir as lesões histopatológicas para confirmar o diagnóstico (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Teste Imunoenzimático – ELISA

Nos testes imunoenzimáticos (ELISA) os antígenos utilizados são taquizoítas inteiros ou lisados, extratos de taquizoítas solúveis em detergente ou em meio aquoso, antígeno natural ou recombinante. O teste de ELISA com antígeno recombinante ainda não está disponível no mercado, entretanto, poderá ser importante ferramenta de diagnóstico no futuro. Os antígenos recombinantes poderão ser produzidos em maior quantidade, com maior facilidade e de modo mais padronizado, para a produção dos testes sorológicos (ZINTL *et al.*, 2006).

A maioria dos testes de ELISA para detectar anticorpos específicos de *Neospora caninum* utiliza como antígenos os taquizoítas lisados. Os valores de especificidade e sensibilidade variam de acordo com o kit comercial utilizado, devido ao tipo de antígeno, a sua concentração, diluição do soro e do conjugado, e especificidade do conjugado para um isotipo em particular, causando as diferenças

dos pontos de cortes dos diversos ELISA do mercado (BJORKMAN & UGGLA, 1999; DUBEY & SCHARES, 2006).

No Brasil, os testes de ELISA utilizados nos laboratórios de diagnóstico têm como problemas o custo elevado, a padronização dos pontos de corte, de sua metodologia de produção e a falta no mercado interno devido à maioria ser importado dos países europeus. Essas dificuldades impedem a realização desse método de diagnóstico de forma mais ampla; e ainda necessitam ser certificado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

2.2.1.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum*. É baseado no princípio da fixação de taquizoítas do protozoário em lâminas de microscopia (BJÖRKMAN & UGGLA, 1999). Como os taquizoítas utilizados para antígeno na RIFI apresentam-se intactos, o teste detecta principalmente anticorpos direcionados para antígenos presentes na superfície celular do parasita (ANDRIANARIVO *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos em diversos hospedeiros têm demonstrado que a RIFI, para *Neospora caninum*, apresenta uma baixa incidência de reação cruzada com outros parasitas (TREES *et al.*, 1999).

O maior problema em relação a RIFI é a falta de padronização dos pontos de corte para as amostras testadas, assim como entre os laboratórios de diagnóstico. Os pontos de corte mais utilizados são: 1: 25, 1: 200 a 1: 640 em bovinos adultos; para os fetos bovinos e recém-nascidos (amostras pré-colostrais), os valores de 1: 80 são indicativos de infecção; para novilhas que receberam o colostro, o ponto de

corte é de 1: 5.120, dificultando a comparação direta dos resultados (BARR *et al.*, 1995; NOORDEHUIZEN *et al.*, 1997). A presença de anticorpos em amostras séricas pré-colostrais de bezerros, sem sinais clínicos, indica a infecção congênita (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001).

A técnica é muito utilizada nos laboratórios para o diagnóstico de neosporose, porém, o título de anticorpos (ponto de corte) depende da qualidade do microscópio de imunofluorescência do laboratório. Conseqüentemente, cada laboratório deveria estabelecer o seu próprio ponto de corte para o teste (DUBEY & SCHARES, 2006).

2.2.2 Diagnóstico parasitológico

2.2.2.1 Exame Histopatológico

O método histopatológico é importante no diagnóstico da neosporose, com a detecção de lesões típicas nos tecidos. As lesões podem ser encontradas em vários órgãos, sendo mais comuns no cérebro, coração e fígado (WOUDA *et al.*, 1997; CORBELLINI *et al.*, 2002).

Nos fetos bovinos as lesões mais características de neosporose são a encefalite multifocal e miocardite não supurativa (WOUDA *et al.*, 1997). Nos cérebros dos fetos os focos de necrose com taquizoítas também podem ser observados (CORBELLINI *et al.*, 2002). A lesão característica de neosporose no sistema nervoso central é o foco de infiltração de células mononucleares ao redor de uma área central de necrose. As lesões no miocárdio consistem de infiltração focal de células mononucleares com necrose mínima (WOUDA *et al.*, 1997). A hepatite foi observada principalmente nos fetos de abortamentos epidêmicos, do que nos abortamentos endêmicos (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2005). As lesões

também estão presentes na placenta, porém o parasita é difícil de ser encontrado (BARR *et al.*, 1991).

Nos cortes histológicos dos órgãos de eleição, como cérebro, coração, fígado e placenta (casos de abortamentos em bovinos), as lesões inflamatórias não supurativas que sugerem a infecção por *Neospora* são observadas pela técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE), sendo confirmadas por outras técnicas, como a imunistoquímica (CORBELLINI *et al.*, 2000). O número de taquizoítas de *Neospora caninum* observados nos tecidos de bovinos é pequeno (WOUDA *et al.*, 1997).

A encefalomielite é a principal lesão observada nos bezerros nascidos vivos, mas clinicamente afetados (ANDERSON *et al.*, 2000).

O exame histopatológico não é uma técnica definitiva para o diagnóstico da neosporose, mas é muito importante para detectar as lesões sugestivas da infecção pelo parasita (CANADA *et al.*, 2002).

2.2.2.2 Imunoistoquímica

O método imunoistoquímico identifica cistos e taquizoítas de *Neospora caninum* em tecidos fetais e fetos mumificados, porém, a autólise diminui a eficiência do diagnóstico. A técnica apresenta maior confiabilidade para demonstrar e confirmar o *Neospora caninum* nas lesões, do que o exame histopatológico, que é sugestivo da infecção (BOGER & HATTEL, 2003). No método imunoistoquímico são utilizados os anticorpos monoclonais e os policlonais, específicos para *Neospora caninum* (COLE *et al.*, 1994). A reação cruzada dos anticorpos anti *Neospora caninum* com os outros protozoários, como *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp., não é considerada problema porque esses parasitas raramente causam abortos em

bovinos (CANADA *et al.*, 2002). No entanto, uma recente comparação de protocolos de imunistoquímica interlaboratorial revelou reações falso-positivas para *Neospora caninum* em cortes de tecidos de um animal infectado por *Toxoplasma gondii* (VAN MAANEN *et al.*, 2004).

Os taquizoítas de *Neospora caninum*, pela técnica da imunistoquímica, foram identificados em 85% dos cérebros, 14% dos corações e 26% dos fígados de 80 fetos com neosporose confirmada sorologicamente (WOUDA *et al.*, 1997). Em fetos de abortamentos bovinos a técnica de imunistoquímica é bem sucedida devido às lesões nos órgãos como cérebro, coração e fígado (MORALES *et al.*, 2001).

2.2.2.3 Isolamento de *Neospora caninum*

As tentativas de isolamento do parasita, na maioria das vezes, não têm sucesso porque a maioria dos parasitas morre no feto quando ocorre a infecção e o abortamento (CONRAD *et al.*, 1993).

O tempo de isolamento de *Neospora caninum in vitro* é de até 60 dias. O método do isolamento é demorado e difícil para ser utilizado na rotina de diagnóstico da doença. Entretanto, é importante e necessário para o estudo e caracterização do parasita (SAWADA *et al.*, 2000).

No isolamento de *Neospora caninum* os tecidos infectados são inoculados em cultivo celular (isolamento *in vitro*) ou em camundongos e gerbis (isolamento *in vivo*).

O protozoário foi isolado de sete fetos bovinos, três bezerros natimortos, nove bezerros com idades entre 1 a 14 dias, um bezerro de 45 dias, uma bezerra cega de três meses, um bezerro assintomático de oito meses e de duas vacas adultas

assintomáticas. O parasita foi isolado na Austrália, no Brasil, na Coréia, na Espanha, nos Estados Unidos, na Inglaterra, na Itália, no Japão, na Malásia, na Nova Zelândia, em Portugal e na Suécia (CONRAD *et al.*, 1993; BARR *et al.*, 1994; SAWADA *et al.*, em 2000; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; DUBEY & SCHARES, 2006).

Várias linhagens celulares de mamíferos são utilizadas para o cultivo de *Neospora caninum in vitro*. A célula Vero é a mais utilizada, porém, não há preferência do parasita por determinada linhagem celular (LEI *et al.*, 2005). O cérebro e a medula espinhal de bovinos, dos fetos e bezerros, são as principais amostras utilizadas para o isolamento de *Neospora caninum* em cultivo celular. Não existe um método padrão para o isolamento do parasita *in vitro*. As amostras de tecidos são homogeneizadas em solução salina para preparar uma suspensão. Nessa suspensão é adicionada a tripsina 0,5%, sendo incubada a 37°C por 30-60 minutos. Após centrifugações e lavagens, o sedimento é inoculado com o meio de cultivo em frascos contendo a monocamada de células estabelecida (CONRAD *et al.* 1993).

Os frascos são examinados diariamente em microscópio invertido para monitorar o isolamento. A monocamada de células deve ser observada quanto a sua integridade, a presença e multiplicação dos parasitas e os efeitos citopáticos. Nos cultivos celulares são isolados os taquizoítas, que se multiplicam destruindo a monocamada. As cepas de *Neospora caninum* isoladas de bovinos apresentam crescimento lento, durante e após o estabelecimento dos cultivos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003).

O isolamento de *Neospora caninum* em camundongos imunodeprimidos é mais eficiente do que o cultivo celular para obter parasitas viáveis. Os camundongos

BALB/c são melhores do que os Swiss-Webster, principalmente quando o material não pode ser cultivado em células, devido à contaminação bacteriana (SAWADA *et al.*, 2000). Na imunossupressão dos camundongos podem ser utilizados o acetato de metilprednisolona ou o acetato de cortisona, via injetável. A via oral é utilizada adicionando-se dexametasona na água (1 µg/ml) no dia da inoculação com homogeneizado de tecido até o camundongo adoecer. Os camundongos morrem 2 a 4 semanas depois da inoculação e os parasitas são encontrados no fígado, pulmão e coração. Cinco semanas após a inoculação os parasitas podem ser encontrados no cérebro (VIANNA *et al.*, 2005).

Os gerbis (*Meriones unguiculatus*) também são susceptíveis a infecção por *Neospora caninum*, mas os parasitas podem desaparecer espontaneamente dos animais inoculados (GONDIM *et al.*, 2001; DUBEY & LINDSAY, 2000).

2.2.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é utilizada para o diagnóstico da infecção por *Neospora caninum*. A maior parte dos protocolos de PCR são utilizados para detectar o DNA de *Neospora caninum* em amostras de tecidos de fetos ou de outros hospedeiros intermediários (PITEL *et al.*, 2001; SAGER *et al.*, 2001).

Na técnica da PCR são realizadas: a extração do DNA das amostras, seguida da amplificação com iniciadores específicos para *Neospora caninum* em termociclador, e os produtos desta PCR são analisados por eletroforese em gel de agarose, identificando-se as bandas conforme o número de pares de bases para os fragmentos de DNA. Recentemente foram desenvolvidos protocolos que além de

detectarem o parasita, quantificam o DNA nas amostras (DUBEY & SCHARES, 2006).

Também estão sendo utilizadas outras amostras na PCR para a pesquisa do DNA de *Neospora caninum*, como líquido amniótico (HO *et al.*, 1997), líquido cérebro-espinhal (SCHATZBERG *et al.*, 2003) e fezes de cães ou coiotes contaminadas com oocistos (BASSO *et al.*, 2001; GONDIM *et al.*, 2004).

O DNA de *Neospora caninum* foi detectado em amostras de sangue de bovinos cronicamente infectados, em sêmen de touro (FERRE *et al.*, 2005) e no leite (MOSKWA *et al.*, 2003). As amostras para diagnóstico da neosporose por PCR são feto, líquido amniótico, placenta, leite, amostras de fezes e do ambiente, como a água (DUBEY & SCHARES, 2006).

Os genes alvos mais utilizados na técnica da PCR são as seqüências de rDNA (18S rDNA, 28S rDNA, ITS1) e o gene pNc5. Os iniciadores para as seqüências do gene pNc5 são o Np6 e Np21 (YAMAGE *et al.*, 1996).

A técnica da PCR é importante para o diagnóstico da infecção por *Neospora caninum* e apresenta maior sensibilidade em fetos do que a imunistoquímica (BASZLER *et al.*, 1999).

A sensibilidade e a especificidade de uma PCR são influenciadas não somente pela seleção do DNA alvo e pelos pares de iniciadores, mas também pelos protocolos, pela coleta e conservação da amostra, extração e purificação da amostra de DNA, pelos reagentes apropriados, pelo programa no termociclador e análises dos fragmentos amplificados (DUBEY & SCHARES, 2006).

2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de diagnóstico sorológico para a neosporose bovina ainda não são padronizadas, dificultando as interpretações dos dados ou comparações. Os pontos de corte são diferentes entre os laboratórios de diagnóstico e de pesquisa, tanto para RIFI quanto para ELISA.

Nos métodos parasitológicos, deve-se ressaltar que apesar da grande prevalência da neosporose bovina, nos vários continentes, ainda são relativamente poucos os casos de isolamento *in vitro* ou *in vivo* do parasita, com sucesso. O exame histopatológico não é uma técnica conclusiva, devido às lesões sugestivas de determinado agente patológico, mas é importante para identificar as lesões típicas do parasita nos tecidos.

As perspectivas para o método da PCR referem-se às pesquisas para identificar a concentração e a localização dos parasitas nos diferentes segmentos do SNC (medula espinhal, cerebelo, córtex). No caso da Raiva são conhecidos os locais para coleta de amostras com maior sensibilidade no diagnóstico por IFD (Tabela 6), sendo necessário este conhecimento também para a neosporose, com a finalidade de se obter um diagnóstico mais preciso e com sucesso, porque o cérebro é o órgão de maior índice de detecção do DNA de *Neospora caninum* (DUBEY & SCHARES, 2006).

Na União Européia (UE) está em andamento a proposta de padronização das técnicas de diagnóstico para *Neospora caninum*, denominada de “Ação COST-854”, sob o título de "Protozoal Reproduction Losses in Farm Ruminants" (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003). A proposta tem como objetivos a normatização das técnicas de diagnóstico e o desenvolvimento de novas metodologias para os casos de abortamento por protozoários nos ruminantes domésticos. Entre as atividades

propostas estão a realização de estudos comparativos entre as técnicas de diagnóstico realizadas nos laboratórios da UE, e a elaboração de um manual de referência, "Guidelines for the Diagnosis of protozoal Abortifacients in Farm Ruminants", com as técnicas e os critérios para o diagnóstico dos abortamentos por *Neospora caninum* e por outros protozoários como *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.* e *Trichomonas foetus*.

Existem perspectivas de estudos e aprimoramento nos exames de diagnóstico da neosporose, como: 1) validação e padronização das provas sorológicas utilizadas rotineiramente (RIFI e ELISA) entre os diferentes laboratórios; 2) descrição dos antígenos específicos de *N. caninum* e 3) desenvolvimento de provas de ELISA que permitam diferenciar infecções recentes de crônicas.

A inclusão da técnica da PCR, como diagnóstico de rotina da neosporose bovina, nos casos com exame histopatológico sugestivo, também deve ser considerada pelos laboratórios, para maior confiabilidade nos resultados.

Nos demais países, incluindo o Brasil, que também apresentam problemas de abortamento por protozoários nos seus rebanhos, também deveriam realizar um estudo para padronizar e desenvolver as técnicas de diagnóstico da neosporose.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle.

Animal Reproduction Science, v. 60-61; p. 417-431. 2000.

ANDRIANARIVO, A.G.; BARR, B.C.; ANDERSON, M.L.; ROWE, J.D.;

PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 817-825. 2001.

BARR, B.C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. **Veterinary Pathology**, v. 28, p. 110-116. 1991.

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

BARR, B.C.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. **Veterinary Record**, n. 137, p. 611-613. 1995.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal Parasitology**. v. 87, p. 612-618. 2001.

BASZLER, T. V.; GAY, L. J.C.; LONG, M. T.; MATHISON, B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37; n. 12; p. 4059-4064. December 1999.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1497-1507. 1999.

BOGER, L.A.; HATTEL, A.L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, n. 113, p. 1-6. 2003.

CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; ROCHA, A.; CORREIA DA COSTA, J.M.; ERIKSON, M.W.; DUBEY, J.P. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally-infected aborted bovine fetuses. **Journal Parasitology**, n. 88, p. 1247-1248. 2002.

COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; BLAGBURN, B.L. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* by western blot analysis and immunoelectron microscopy. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p. 1717-1722. 1994.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., RODRIGUEZ-BERTOS, A., ARNAIZ-SECO, I., MORENO, B., ADURIZ, G., ORTEGA-MORA, L. M. Influence of the stage of

pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**. n. 65; p. 629-641. 2005.

CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; SVERLOW, K. W. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine foetuses. **Parasitology**, v. 106, p. 239-249. 1993.

CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103; p. 195-202; 2002.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, v. 86, p. 165-168. 2000.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 140, p. 1-34. 2006.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, n. 63, p. 1504-1518. 2005.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESÚS, E. E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNÁNDEZ, H.S.; ALMEIDA, M.AO; 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, n. 1, p. 1-7. 2001.

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 n. 02; p. 159-161. 2004.

HO, M. S. Y.; BARR, B. C.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M.L.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM, K.W.; MARSH, A. E.; CONRAD, P. A. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. **Journal Parasitology**, v. 83, p. 508-514. 1997.

JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine. **International Journal for Parasitology**, 32, n. 5, p. 631-636. 2002.

LEI, Y.; DAVEY, M.; ELLIS, J.T. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines *in vitro*. **Parasitology**, v. 131, p. 583-590. 2005.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VAN DER VINNE, R.; SILVA, R.; LEITE, L.C.; PINCKNEY, R.

Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras e bezerros no Estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 6, n. 2, 37-41. 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.B.T.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, n. 153, p. 366-367. 2003.

MOORE, D. P., LEUNDA, M. R., ZAMORANO, P. I., ODEÓN, A. C., ROMERA, S. A., CANO, A., DE YANIZ, G., VENTURINI, M. C., CAMPERO, C. M., Imunne response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. **Veterinary Parasitology**. n.130; p. 29-39. 2005.

MORALES, E.; TRIGO, F.J.; IBARRA, F.; PUENTE, E.; SANTACRUZ, M. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p. 58-63. 2001.

NOORDEHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, C.M.; GRAAT, E.A.M. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. **Wageningen Pers**, p. 445. 1997.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ;

ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.111, p. 143-152. 2003.

PFALLER, M. A. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: Practicality and costs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7; n. 2, p. 312-318. 2001.

PITEL, P. H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLEST, J. J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* in cattle and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 4, p. 269-277. 2001.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum* – associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**. v. 102; Issues 1-2; p. 1-15. 2001.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from brain a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 247-252, 2000.

SCHATZBERG, S. J.; HALEY, N. J.; BARR, S. C.; DE LAHUNTA, A.; OLBY, N.; MUNANA, K.; SHARP, N. J. H. Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the

central nervous system of cats and dogs. **American Journal Veterinary Research**, n. 64, p. 1507-1513. 2003.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. *Neospora caninum* infection and abortion in cattle. **American Journal Veterinary Research**. v. 4, p. 425-431.1999.

THURMOND, M. C, HIETALA, S. K, Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practical**. n. 29; p. 60-63. 1995.

TREES, A.J.; DAVIDSON, H.C.; INNES, E.A.; WADTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal Parasitology**, v.29, p. 1195-1200. 1999.

VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; SCHARES, G.; VON BLUMRÖDER, D.; CONRATHS, F.J.; NORTON, R.; WILLIAMS, D.J.L.; ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E.A.; MATTSON, J.G.; BJÖRKMAN, C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; ORTEGA-MORA, L.M.; MÜLLER, N.; SAGER, H.; HEMPHILL, A. An Interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, n. 126, p. 351-364. 2004.

VIANNA, M.C.B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 253-257. 2005.

WALDNER, C.L. JANSEN, E.D., RIBBLE, C.S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 685-690. 1998.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; McGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHERN, K.; CRIPPS, P.J.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v. 121, p. 347-358. 2000.

WOUDA, W.; MOEN, A.R.; VISSER, I.L. & VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: A comparison of epizootic and sporadic and abortion cases and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v. 9, p. 180-185. 1997.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide iniciadores for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279. 1996.

ZINTL, A.; PENNINGTON, S.R.; MULCAHAY, G. Comparison of different methods for the solubilisation of *Neospora caninum* (Phylum Apicomplexa) antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 205-213. 2006.

3. PREVALÊNCIA DA RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2004 E 2006

RESUMO

A raiva é uma doença infecto-contagiosa, causada por um vírus RNA, da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. A doença é caracterizada por sintomatologia nervosa e quase 100% dos casos são fatais. No Brasil o morcego hematófago, quase que exclusivamente a espécie *Desmodus rotundus*, é o principal disseminador da doença nas áreas rurais. O objetivo deste artigo foi realizar um estudo retrospectivo das amostras de bovinos enviados para diagnóstico de raiva, ao Centro de Diagnóstico 'Marcos Enrietti' (CDME), da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB/PR), no período entre 2004-2006. Foram analisadas, no total, 760 amostras de bovinos, sendo: 228 amostras em 2004; 185 amostras em 2005; e 347 amostras em 2006.

As técnicas utilizadas foram a Imunofluorescência direta (IFD) e a Prova Biológica (inoculação intracerebral em camundongos - PB) para este diagnóstico.

Em 2004, foram positivos para raiva 66/228 (28,8%) bovinos; em 2005, houve uma diminuição do número de amostras desta espécie; porém, a prevalência aumentou; sendo que, o número e porcentagem de animais positivos foram de 55/185, e 29,1% respectivamente. E em 2006, houve um aumento no número de amostras bovinas enviadas e na prevalência da raiva em relação aos anos anteriores. O número e porcentagem de animais positivos para raiva em bovinos foram, respectivamente, de 165/347 e 47,5%.

Analisando o total dos animais no período estudado, observou-se que dos 760 bovinos, 286 (37,6%) foram positivos; e que, portanto, 474 amostras foram

negativas ficando em sua grande maioria sem diagnóstico conclusivo definitivo. Todos os materiais suspeitos de raiva e coletados pelos Médicos Veterinários das Unidades Veterinárias da SEAB/PR, são enviados para o Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, onde são realizadas as provas de IFD e PB para confirmar a presença desta doença na região e conseqüente circulação do vírus, o que contribui para tomada de decisões sobre a prevenção e controle desta enfermidade.

Palavras chaves: raiva, bovino, Paraná.

Key words: rabies, bovine, Paraná State.

3.1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença causada por um RNA vírus da família *Rhabdoviridae* e do gênero *Lyssavirus* (MURPHY *et al.*,1999). É uma enfermidade de notificação obrigatória, invariavelmente fatal, que se manifesta com sinais nervosos afetando principalmente o sistema nervoso central (SNC) da maioria dos mamíferos domésticos e silvestres, inclusive os seres humanos (BARROS *et al.*,2006).

Na América Latina e no Brasil, podemos citar o *Desmodus rotundus* como o principal disseminador da doença (LIMA, 2001). Isso não descarta a possibilidade de que morcegos frutíferos, como exemplo o *Artibeus lituratus* e morcegos insetívoros como o *Nyctinomops laticaudatus* serem responsáveis pela transmissão da raiva (DEUS *et al.*, 2003).

A transmissão da doença se dá pela penetração do vírus presente na saliva do animal raivoso, pela mordedura, arranhadura e lambedura de mucosas e/ou peles com solução de continuidade. A raiva pode apresentar três ciclos: o urbano, onde o principal disseminador é o cão seguido do gato. O rural, onde os animais alvos são os herbívoros (bovídeos, eqüídeos, ovinos e caprinos) no qual o principal disseminador é o morcego. E o ciclo silvestre representado pelos carnívoros como a raposa, guaxinins além de primatas não humanos (sagüis) e morcegos (DEUS *et al.*, 2003).

A doença tem duas formas distintas de se manifestar. Uma em que os animais apresentam-se agressivos podendo até atacar outros animais que seria a raiva furiosa no sentido denotativo da palavra que ocorre principalmente no ciclo urbano, mas pode ocorrer em herbívoros cuja forma da doença que se manifesta é a parálitica a mais predominante em bovinos no Brasil, o animal apresenta sinais de depressão, prostração, incoordenação seguida de paralisia dos membros pélvicos,

ausência do reflexo anal, paralisia da cauda, tremores da cabeça, diminuição da visão, opistótono, bruxismo, salivação, fezes ressequidas ou escassas, retenção ou incontinência urinária, mugidos e roncos (BARROS *et al.*, 2006).

O exame laboratorial de imunofluorescência direta (IFD) é o mais usado na rotina, por ser rápido e proporcionar resultados confiáveis em 90 a 99% dos casos segundo a Officer Internacional Des Epizooties (OIE, 2007).

Os materiais suspeitos de raiva foram coletados pelos Médicos Veterinários das unidades veterinárias da SEAB no Paraná, e enviados para o Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

No período entre 2004 e 2006, o setor de Virologia do Centro de Diagnósticos 'Marcos Enrietti' – CDME recebeu 760 amostras de bovinos do Estado do Paraná para exame laboratorial de Raiva. As amostras de tecido encefálico (cerebelo, medula oblonga e córtex cerebral) foram submetidas às técnicas de diagnóstico de Imunofluorescência direta (IFD), descrita por DEAN *et al.*, 1996; com conjugado produzido pelo LANAGRO/MAPA/MG com isotiocianato de fluoresceína, e inoculação intracerebral ou prova biológica (PB) segundo a técnica de Koprowski.

Sendo que para a IFD utilizou-se o vírus fixo 'Challenge Virus Standard' (CVS), amostra CVS-31/2, adaptada a cérebros de camundongos, apresentando título de 10^5 DLIC₅₀/0,03mL para a obtenção da suspensão de vírus, para a absorção do conjugado anti-rábico; e cérebros de camundongos de 21 dias para a suspensão contendo conjugado anti-rábico livre; todas as IFD de amostra sempre foram acompanhadas de lâmina de VR (Vírus referência) como controle positivo. As lâminas são preparadas com glicerina tamponada pH 8,5, e lamínulas e em seguida

a leitura realizada em microscópio de imunofluorescência marca Olympus (CBA/Japan) com oculares de 10x e objetivas de 40x, sob fonte de excitação por lâmpada de UV, com filtro verde e comprimento de onda aproximadamente entre 300 e 400nm.

Para a PB foi preparado um macerado em graal e areia estéril com pistilo de porcelana de todos os materiais enviados (amostras coletadas) com os fragmentos encefálicos utilizados para a impressão, das lâminas de IFD, acrescidos de uma solução para inóculos, constituída de solução buffer fosfatada (PBS) a 0,85%, acrescida de 2% de soro eqüino isento de anticorpos anti-rábicos, pencilina G potássica 100.000 UI/L, estreptomicina 200 µg/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL obtendo-se uma suspensão que fora mantida sob refrigeração por uma hora e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos; em seguida foi realizada a inoculação intracerebral em camundongos de 0,03 mL do sobrenadante desta suspensão, os camundongos utilizados eram de 21 dias de idade, e peso entre 12 e 14 g, obtidos do biotério do TECPAR (Instituto Tecnológico do Paraná). Foram utilizados grupos de oito camundongos (indivíduos) para cada amostra recebida. Após a inoculação, os animais foram observados diariamente durante 30 dias; sendo que para os casos positivos os óbitos ocorreram entre o 5° e 15° dias após a inoculação (em média) e a partir do 5° dia após a inoculação qualquer óbito dos camundongos foi submetido à prova de IFD, para confirmação.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir referem aos obtidos nas duas técnicas de diagnóstico mencionadas no período entre 2004 e 2006. Sendo que em 2004,

foram positivos para raiva 66 de 228 amostras processadas de bovinos (28,8%). Em 2005, houve uma diminuição do número de amostras enviadas, porém a prevalência aumentou para estes; obtendo-se 55 amostras positivas em 189 processadas. Em 2006, houve um aumento no número de amostras enviadas e na prevalência da raiva em relação aos anos anteriores; obtendo-se 165 amostras positivas em 347 amostras processadas (gráfico 1).

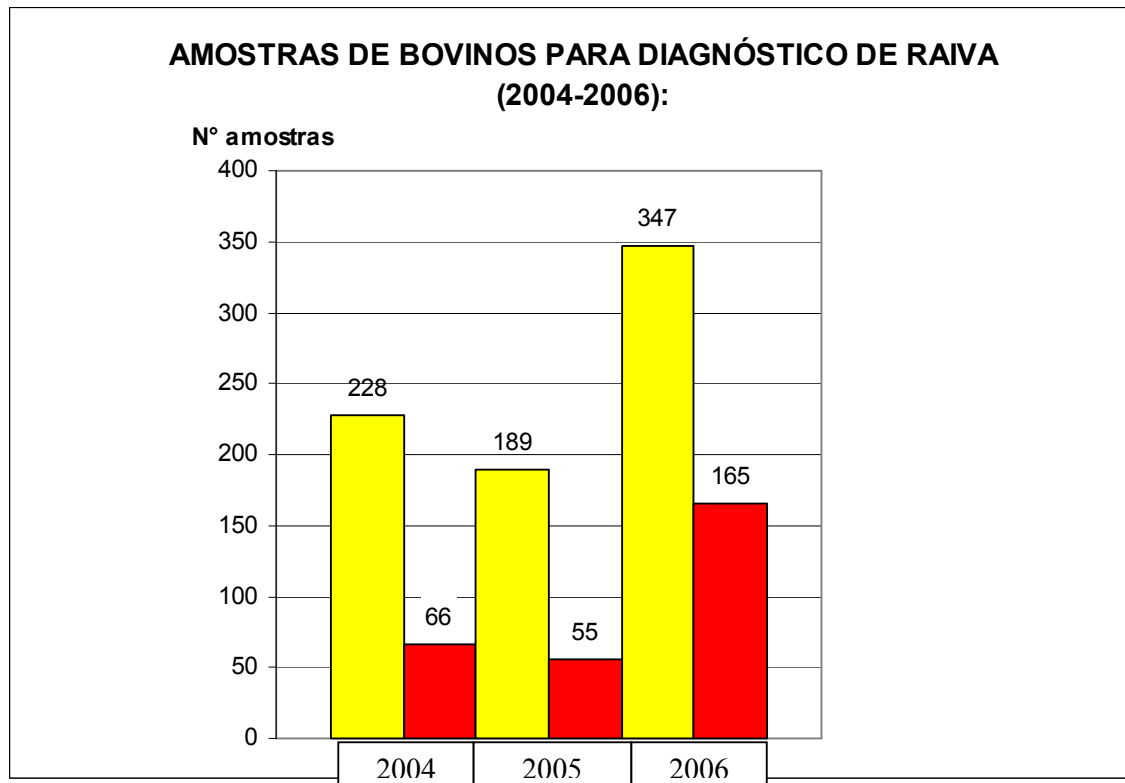
Analisando-se o total de amostras processadas no período estudado, observou-se que 286 foram positivas entre as 760 processadas, dando um percentual de 37,6% de positividade, e apresentamos a sua distribuição geográfica nas figuras 2 e 3.

Neste período obtivemos um número significativo de amostras negativas para raiva que em número absoluto é de 474 em 760 amostras processadas, o que em percentagem se traduz num índice de 62,4%; levando ao questionamento inicial desta pesquisa.

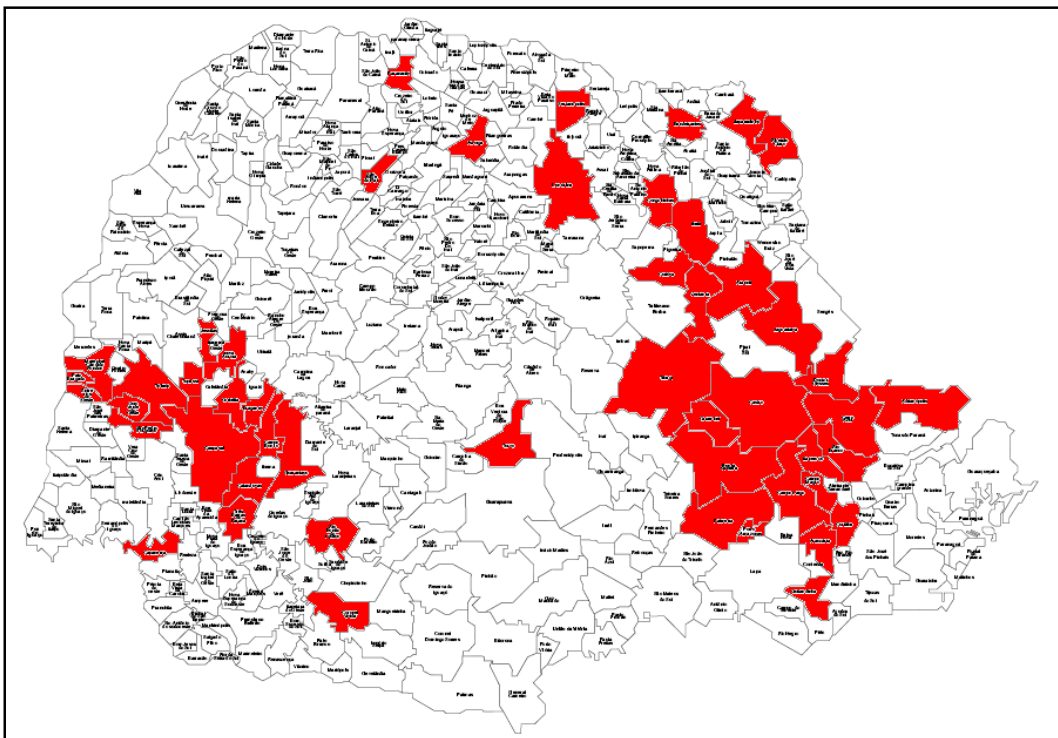
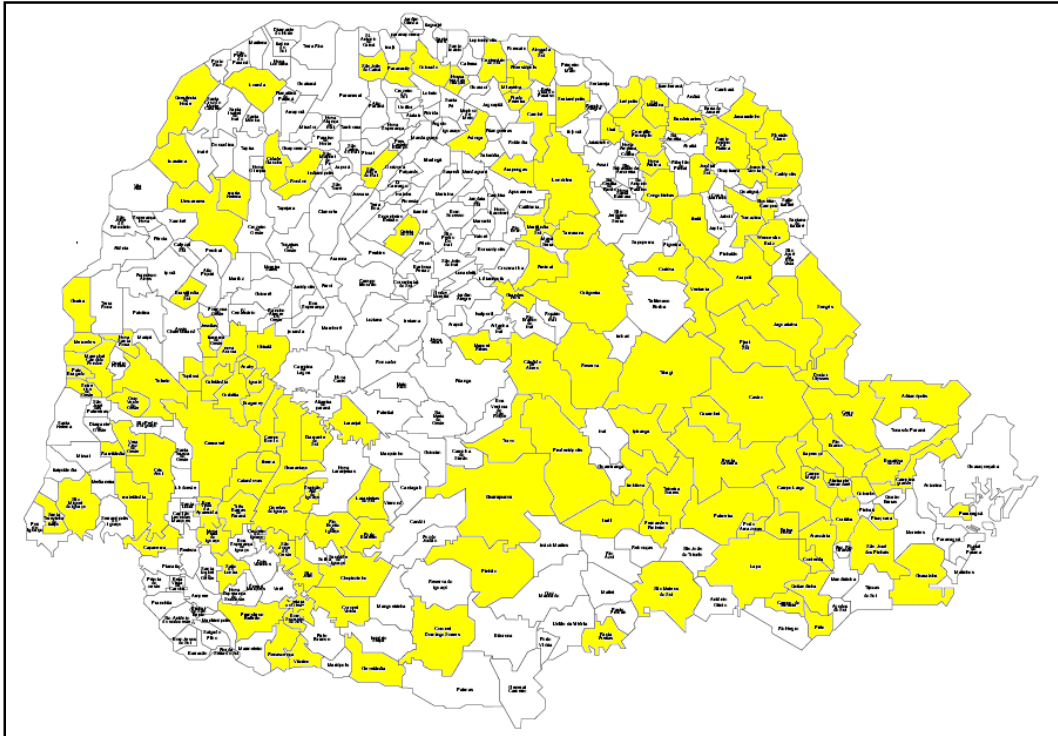
E pela observação dos números apresentados neste capítulo conclui-se que um grande percentual (62,4%) das amostras que chegam para o diagnóstico de Raiva apresenta resultado negativo e devem ser pesquisadas quanto a outras doenças para um diagnóstico diferencial.

Portanto, muitas das amostras que neste período obtiveram resultado negativo para o diagnóstico de Raiva foram processadas para neosporose através da técnica de PCR que é o estudo desta dissertação.

Gráfico 1 – Representa a distribuição de amostras processadas (amarelas) e positivas (vermelhas) para diagnóstico de Raiva no período entre 2004 e 2006 para a espécie bovina que foram enviadas para o CDME.



Figuras 2 e 3 – Mapas do Estado do Paraná que apresentam os municípios que tiveram amostras processadas (amarelas) e municípios com amostras positivas (vermelho) para Raiva no período entre 2004 – 2006.



REFERÊNCIAS

BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS, R. A. A. **Bovinos: Doenças do Sistema Nervoso.**

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. editors. **Laboratory Techniques in Rabies.** 4ª edition. Geneva : World Health Organization. p. 88-95. 1996.

DEUS, G. T.; BECER, M.; NAVARRO, I. T. Diagnóstico de raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Centro Oeste do Brasil: descrição de casos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 171-176, 2003.

LIMA, M. Alerta Vermelho. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Zebu.** v. 1, n.3, 2001.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology.** 3rd ed, Academic Press, 1999.

OIE – Officer Internacional Des Epizooties, informações disponíveis:
<<http://www.oie.int/eng/rabies2007.htm>. Acesso em: 30 Ago 2007.

4. INVESTIGAÇÃO DE NEOSPOROSE EM ENCÉFALOS DE BOVINOS, PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), COM QUADRO DE ENCEFALOPATIA E DIAGNÓSTICO NEGATIVO PARA RAIVA, NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário parasita que causa aborto e mortalidade neonatal, principalmente em bovinos, e doenças neuromusculares em cães. Este estudo objetivou determinar a presença do DNA do parasita em encéfalos de bovinos com sinais neurológicos. Foram avaliadas 253 amostras de encéfalos, sendo 161 de animais adultos e 92 de bezerros, procedentes de todas as regiões do Paraná e com diagnóstico negativo para raiva, pelas técnicas de imunofluorescência direta e prova biológica. As amostras coletadas continham fragmentos de medula oblonga, cerebelo e córtex (principalmente da região posterior do cérebro). Para o diagnóstico da neosporose, os encéfalos foram submetidos à técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os *iniciadores* Np6 e Np21. Foram detectadas 28 amostras positivas, representando uma prevalência de 11,07%. *Neospora caninum* foi detectado nos bovinos de corte e de leite, de todas as faixas etárias, e procedentes de todas as regiões do Paraná. Os resultados indicaram a presença do parasita nos bovinos adultos com sinais neurológicos, sugerindo que o diagnóstico da neosporose deva ser incluído nos casos de doenças neurológicas.

Palavra-chave: *Neospora caninum*, bovinos com sinais neurológicos, PCR.

ABSTRACT

Neospora caninum is a parasite protozoa that causes abortion and neonatal mortality, especially in cattle, and neuromuscular disease in dogs. The aim of this study was to determine the presence of the parasite's DNA in the encephalon of bovines with neurological signs. A total of 253 encephalon samples, 161 from adult animals and 92 from calf were evaluated. The samples, from all regions of Parana state, were negative for rabies with both the direct fluorescent antibody test and biological technique. The analyzed samples contained parts of the medulla oblongata, cerebellum and cortex (mainly from the posterior region of the brain). The samples were analyzed with the Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers Np6 and Np21 to diagnose neosporosis. A prevalence of 11,07% (28 samples) was found and *Neospora caninum* was identified in dairy and beef cattle, adults and calves, from all regions of Parana state. The results showed the presence of the parasite in adult cattle with neurological signs indicating the importance of including neosporosis in the differential diagnosis in cases of neurological diseases.

Key-words: *Neospora caninum*, bovine with neurological signs, PCR.

4.1 INTRODUÇÃO

Em bovinos, a importância da neosporose até então está relacionada com a causa de abortamento, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes.

A infecção fetal por *Neospora caninum* pode causar anormalidades no sistema nervoso central, caracterizando a neosporose clínica. A doença afeta principalmente o sistema nervoso central, e os sinais neurológicos nestes animais podem ser ataxia, diminuição dos reflexos patelares, paralisia, opistótono e incoordenação, exoftalmia ou aparência assimétrica dos olhos, cegueira, deformações associadas com lesões das células nervosas embrionárias. Os animais que nascem sem sinais clínicos são portadores do parasita e reservatórios potenciais no rebanho (LINDSAY & DUBEY, 1990).

Este parasita encista-se em tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo e nervos) na retina e no músculo esquelético. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro. Nos bezerros com neosporose congênita, os cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal (LINDSAY & Dubey, 1990).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos desta pesquisa foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- A. Obtenção e armazenamento de amostras de cérebro bovino;
- B. Cultivo celular

C. Cultivo de *Neospora caninum* para utilização como controle positivo na técnica de PCR;

D. Realização da técnica da PCR, com as seguintes fases: extração do DNA, amplificação, eletroforese, captação de imagem dos géis processados;

E. Análise e avaliação dos dados obtidos.

A infraestrutura utilizada para a realização do projeto compreendeu os laboratórios de Cultivo Celular e de Biologia Molecular do Centro de Diagnósticos “Marcos Enrietti”, da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (CDME/SEAB); e laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.2.1 ANIMAIS E AMOSTRAS

As amostras de encéfalo bovino (fragmentos de medula oblonga, cerebelo e córtex) foram procedentes de propriedades rurais encaminhadas para diagnóstico de raiva pela equipe de médicos veterinários das unidades veterinárias da SEAB/PR, eram de animais com idade entre dois meses até adultos, que apresentaram sinais neurológicos e foram a óbito espontaneamente (não eutanasiados), num período retrospectivo compreendendo o final do segundo semestre de 2003 e o primeiro semestre de 2006; somando um total de 253 amostras processadas.

Por se tratar de quadro neurológico suspeito de Raiva os animais não foram eutanasiados, em virtude da recomendação que existe, através de Instrução normativa do Ministério da Agricultura, para que nestes casos se aguarde o óbito espontâneo, devido a Raiva ser uma zoonose de grande importância e fatal; e que

em caso de eutanásia pode levar a um resultado falso negativo na Imunofluorescência direta.

Ao obter resultado negativo para aquele diagnóstico, nas duas técnicas padrões Imunofluorescência direta - IFD e Prova biológica - PB, as amostras foram armazenadas em congelador com temperatura de 80 graus negativos, para serem processadas pela técnica da PCR para detecção do DNA de *Neospora caninum* posteriormente.

As amostras foram descongeladas em geladeira, maceradas, depois pesadas e reservadas em tubos plásticos com capacidade para 2 mL em temperatura 80°C negativos até o momento de serem processadas.

4.2.2 CULTIVO CELULAR

O Cultivo de células foi realizado com linhagem de células pré-estabelecidas, denominadas Vero (células de rim de macaco verde africano) e com identificação CCL-81, no catálogo da “American Type Culture Collection – ATCC”, o qual foi utilizado para manter as cepas dos protozoários *Neospora caninum* (cepa NC-1).

Protocolo 1

A. Cultivar as células em garrafas de cultivo celular com Meio Essencial de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de caldo triptose fosfato (TPB), 100 UI/mL de penicilina G potássica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,25 µg/mL anfotericina B.

B. O MEM foi utilizado com o pH entre 7,4 e 7,6; para o cultivo celular, sendo ajustado com bicarbonato de sódio a 7,5%. Após o preparo, uma amostra do MEM era inoculada no meio de enriquecimento para crescimento bacteriano, o caldo de

cérebro-coração – BHI, por 72 horas, a 37°C, para detectar possíveis contaminações bacterianas.

C. As garrafas de cultivo celular devem ser mantidas em estufa com 5% de CO₂, em temperatura de 37°C e umidade.

D. Observar as garrafas em microscópio ótico invertido para avaliação do crescimento celular, bem como a adesão das células e formação de monocamada, e para avaliações das etapas do cultivo e subcultivos.

E. Realizar subcultivos através da transferência de células de uma garrafa de cultivo para outro(s).

F. Com a utilização de tripsina até as células se isolarem, e serem transferidas para novas garrafas de cultivo identificar o tipo de célula, número de seqüência de passagens (relativos ao número subcultivos).

G. Os subcultivos devem ser realizados de duas a três vezes por semana, em cabine de fluxo laminar, para ocorrer formação da nova monocamada. As garrafas de cultivo com monocamadas de 24 horas podem ser utilizadas para inocular a cepa NC-1 de *Neospora caninum* (*in vitro*).

4.2.3 CULTIVO DOS TAQUIZOÍTAS DA CEPA NC-1 DE *Neospora caninum* em CÉLULAS VERO (*in vitro*)

A cepa do protozoário foi cultivada e mantida em células Vero, sendo que os cultivos foram monitorados através da leitura das garrafas em um microscópio ótico invertido, avaliando a multiplicação dos parasitas e os efeitos citopáticos causados na monocamada.

Protocolo 2

A. Após inocular as garrafas de células com a cepa NC-1 mantê-las em estufa com 5% de CO₂, em temperatura de 37°C e umidade.

B. Observar diariamente o cultivo das cepas do protozoário em um microscópio invertido. Tendo o objetivo de avaliar a multiplicação dos parasitas *in vitro*, e os efeitos citopáticos causados na monocamada, a presença e o comportamento das cepas nas células.

C. Transferir os parasitas para novas garrafas com monocamadas de células pré-formadas (24 horas), e realizar novas passagens para a manutenção destes.

A finalidade do cultivo desta cepa era a obtenção de sedimento parasitário para a extração de seu DNA e realizar a PCR, para a utilização como controle positivo quando do processamento das amostras.

4.2.3.1 Descongelamento e produção de cepa NC-1 de *Neospora caninum*

Protocolo 3

A. Retirar a ampola do congelador 80°C negativos, procedendo então, um choque térmico ao colocá-la em banho-maria 37°C até seu completo descongelamento.

B. Centrifugar a 2.500 rpm por dez minutos;

C. Ressuspender em meio de crescimento MEM, acrescido de 1.000 UI/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 200 mg/mL de anfotericina B) em cabine de fluxo laminar.

D. Inocular o sedimento em garrafas de células Vero com monocamada de 24 horas e mantido em estufa de CO₂; a temperatura de 37°C.

E. Observar diariamente os cultivos em microscópio ótico invertido.

F. Avaliar os efeitos citopáticos na monocamada e o desenvolvimento dos protozoários.

G. Realizar as passagens dos parasitas para garrafas com monocamadas novas semanalmente.

H. Incubar a 37°C, durante período de 30 minutos a 1 hora, homogeneizar suavemente duas a três vezes neste período, até se isolarem ou se soltarem.

I. Centrifugar por 10 minutos a 2600 rpm a 6°C, desprezar o sobrenadante.

J. Ressuspender o sedimento com um a três mL de meio de manutenção MEM 25 mL de solução salina estéril (0,85% p/v) ou em PBS (Solução tampão fosfato ao pH 7,2), com 1.000 UI/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina em cabine de fluxo laminar.

K. Colocar de 0,5 a 1,0 mL da suspensão em garrafa (25 cm²) de cultivo celular, com monocamada de células Vero (células de linhagem) de 24 horas; e incubar em estufa de CO₂, a temperatura de 37°C.

4.2.3.2 Obtenção de parasitas para extração de DNA (controle positivo)

Os cultivos da cepa NC-1 referência para *Neospora caninum* foram realizados, *in vitro* (em células Vero), para a obtenção do sedimento parasitário. A extração do DNA foi realizada no sedimento parasitário para obter o controle positivo para a PCR.

Protocolo 4

A. Após infecção de 90 a 100% da monocamada de células Vero, retirar os parasitas com tripsina a 0,25% durante 5 minutos, e coletar a suspensão para tubos de centrífuga com capacidade de 50 mL estéreis.

- B. Centrifugar a 3.500 rpm durante 25 minutos a quatro graus Celsius.
- C. Retirar o sobrenadante, e lavar o sedimento com solução de cloreto de sódio a 0,9% ou PBS (pH 7,2).
- D. Centrifugar a 3.500 rpm durante 25 minutos a quatro graus Celsius.
- E. Desprezar o sobrenadante, acrescentar 1,0 mL da solução A ao sedimento; homogeneizar e transferir para os tubos cônicos com capacidade para 2 mL estéreis e previamente pesados.
- F. Centrifugar a 10.000 rpm durante 25 minutos a quatro graus Celsius.
- G. Retirar todo o sobrenadante, pesar o sedimento do tubo. E armazenar a 80°C negativos, até a etapa de extração do DNA.

4.2.4 Técnica de Biologia Molecular – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis (1987), foi utilizada para a detecção de determinado fragmento do ácido desoxirribonucléico (DNA) de *Neospora caninum* nos encéfalos de bovinos.

Na técnica de PCR foram realizadas as etapas de extração, amplificação e eletroforese (itens 2, 3 e 4 nos Anexos, respectivamente).

A extração do DNA foi realizada nas amostras pelo método que utiliza fenol/clorofórmio/etanol; e submetidas à amplificação utilizando-se iniciadores (Np6 e Np 21, conforme tabela 1 – YAMAGE *et al.*, 1996) específicos para o *Neospora caninum* cepa NC-1. A amplificação foi realizada em termociclador e os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. As imagens dos géis foram capturadas utilizando um Sistema de fotodocumentação, composto de transiluminador de ultravioleta e fotografada.

Tabela 1 - Especificações dos iniciadores (senso e anti-senso) utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do *Neospora caninum* (YAMAGE *et al.*, 1996):

Iniciadores	Seqüência (5'-3')	Sentido	Posição*
Np6	CAG TCA ACC TAC GTC TTC T	anti-senso	758-776
Np21	GTG CGT CCA ATC CTG TAA C	senso	449-467

C – citosina; T – timina; A – adenina; G – guanina. *Posição do *primer* na seqüência do DNA de *Neospora caninum*.

As medidas preventivas para evitar contaminação das amostras, dos reagentes e equipamentos utilizados na técnica foram: armazenamento dos reagentes em alíquotas, limpeza de fluxo laminar prévia com álcool 70% e cerca de 15 minutos de exposição aos raios ultravioleta, utilização de micropipetas separadas para amplificação e para manipulação dos produtos; com ponteiros descartáveis, e ponteiros com filtro; utilização de luvas de procedimento descartáveis e aventais; manipulação em fluxo laminar distinto para cada etapa do processamento.

As soluções, tampões e os protocolos foram utilizados neste, estão apresentados no item 1 dos Anexos.

4.2.4.1 Extração do DNA das amostras de encéfalo e do sedimento parasitário

As amostras armazenadas após o diagnóstico negativo para Raiva foram pesadas (cerca de 100 a 110 mg) da amostra contendo fragmentos de córtex cerebral, cerebelo e medula oblonga, homogeneizadas em placa de Petri com lâminas de bisturi nº11 e colocadas em tubos cônicos com capacidade para 2 mL e reservadas no 80°C negativos até que todas as amostras passassem por esta etapa.

A primeira etapa da extração foi uma preparação prévia com a tripsinização das amostras pesadas, em temperatura de geladeira por 18 a 24 horas em agitador.

Na seqüência foi realizado o rompimento das membranas celulares, remoção de RNA e solubilização das membranas lipoprotéicas através do tampão de lise TE, detergente, proteinase K e RNase.

Na etapa seguinte foram realizadas as fases de desproteinização do DNA em três extrações com solventes orgânicos, fenol, a mistura fenol/clorofórmio/etanol, e o clorofórmio. Com a finalidade de desnaturar e dissolver as proteínas, e retirar os contaminantes como os lipídeos e outras macromoléculas. Após a adição dos solventes orgânicos, a suspensão foi centrifugada para separar as fases orgânica e aquosa. Os contaminantes ficaram retidos na fase orgânica inferior e o DNA na fase aquosa superior, que foi recuperada em novos tubos plásticos cônicos com capacidade para 2 mL.

Nesta última etapa da extração foi realizada a precipitação do DNA com etanol e o acetato de sódio, quando o DNA forma um suave precipitado. Após várias lavagens do DNA com etanol frio, o sedimento foi secado com os tubos invertidos em papel toalha absorvente, por 15 minutos em estufa seca a 37°C. O sedimento foi ressuspenso em TE 1X e RNase na concentração de 10µg/mL; e mantidos sob refrigeração por uma hora, depois congelados a 80°C negativos até a etapa da amplificação em termociclador.

A. Das amostras

As amostras extraídas e armazenadas a 80°C negativos foram retiradas do congelador permanecendo em geladeira até serem descongeladas lentamente e manipuladas em fluxo laminar previamente preparado.

B. Parasitas da cepa NC-1

Os sedimentos parasitários obtidos nos cultivos foram mantidos congelados, sendo processados pelo mesmo protocolo de extração utilizado para as amostras de encéfalos.

4.2.4.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Este método foi utilizado para amplificar as seqüências de DNA de *Neospora caninum* cepa NC-1 e das amostras de encéfalos de bovinos, utilizando iniciadores específicos para este agente. O método é uma síntese enzimática *in vitro* das seqüências de DNA, onde se obtém 'n' cópias do fragmento desejado (produtos da amplificação) que foram detectados através da técnica da eletroforese em gel de agarose. Os iniciadores utilizados na solução de amplificação (MIX) foram desenvolvidos por YAMAGE *et al.* (1996), a partir de determinado fragmento específico de DNA que tem como região alvo pNc5 através da utilização de iniciadores Np6 e Np21 para *Neospora caninum* como consta na tabela 1. A seqüência de DNA encontra-se a disposição no GenbankTM, sob número de acesso X84238.

A. Solução de amplificação (MIX)

Na PCR foi utilizada uma solução de amplificação (MIX) utilizando como diluente água ultrapura, tampão, um par de iniciadores específicos (senso e anti-senso), mistura de nucleotídeos (dNTPs), íons de magnésio (Cloreto de Magnésio), a enzima *Taq* polimerase e o DNA extraído.

Os reagentes utilizados no preparo do MIX de amplificação para PCR, suas respectivas quantidades encontram-se na Tabela 2.

O DNA foi descongelado no momento de sua utilização, ressuspendido em água ultrapura e mantido em geladeira (2 a 4°C) enquanto se realizava o preparo do MIX de amplificação.

As soluções de amplificação ou MIX foram elaboradas em fluxo laminar com preparação prévia. Esta solução foi manipulada sempre em banho de gelo, sendo adicionada de Taq polimerase somente após adição das amostras de DNA diluídas em água ultrapura estéril. Esta solução foi amplificada em termociclador, com o programa conforme YAMAGE *et al.*, 1996 (Item 3.7 dos Anexos).

Após a amplificação, os produtos foram mantidos em geladeira por 12 horas até a realização da eletroforese em gel de agarose.

B. Amplificação do DNA

As amostras foram incubadas no termociclador, em três temperaturas, para ocorrer o processo de amplificação. Sendo que estas temperaturas foram a de desnaturação do DNA, de anelamento ou hibridização, e a de extensão. O termociclador foi programado para realizar a operação conforme protocolo do Item 3.7 nos Anexos.

Tabela 2 – Reagentes utilizados no preparo do MIX de amplificação para PCR de fragmentos de DNA de *Neospora caninum* suas concentrações de trabalho, concentrações por reação e seus respectivos volumes.

Reagente	[] de trabalho	[] por reação	μL por reação
PCR tampão	10X	1X	3μL
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,9μL
DNTPs mix (4)	10mM	0,8mM	2,4μL
Iniciador Np6	10μM	0,5μM	1,5μL
Iniciador Np 21	10μM	0,5μM	1,5μL
Taq DNA polimerase	5U/μL	1U	0,2μL
Subtotal			9,5 μL
DNA extraído			3μL
Água ultrapura estéril	--	--	17,5μL
Total	--	--	30

C. Eletroforese em gel de agarose

Após o processo de amplificação os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (protocolo do item 4 nos Anexos). Na eletroforese foram utilizados os marcadores Invitrogen (600) e Promega (500) 100 pb-DNA Ladder. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador, sob luz ultravioleta. As imagens dos géis foram capturadas e arquivadas em computador.

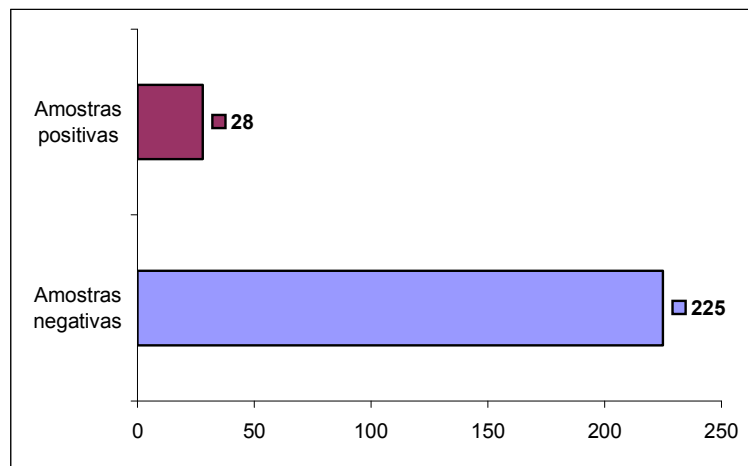
4.3 RESULTADOS

Das 253 amostras de encéfalos de bovinos com histórico de sinais neurológicos, e todas com resultado negativo para diagnóstico de Raiva pelas duas técnicas (Imunofluorescência direta - IFD e Prova biológica - PB), 28 amostras foram positivas para *Neospora caninum* pela técnica de PCR (como se pode observar na Tabela 3 a distribuição das amostras processadas e positivas em cada ano que foram coletadas as amostras; e na figura 5 que ilustra algumas das amostras positivas e negativas processadas); representando uma prevalência de 11,07% das amostras processadas (gráfico 2), em vinte municípios de diversas regiões no Estado do Paraná (figura 4). Sendo que nestas encontramos animais das diferentes faixas etárias, diferentes raças, em várias regiões geográficas do Estado do Paraná, conforme tabela 4 e gráficos 7 e 8 a seguir.

Tabela 3 – Número de amostras processadas e positivas para *Neospora caninum* em cada ano, em número absoluto e porcentagem.

ANO	2003		2004		2005		2006	
Total de amostras processadas	18	100%	44	100%	108	100%	83	100%
Total de amostras positivas	4	18%	0	0%	23	18%	1	1%

Gráfico 2 – Distribuição das amostras positivas e negativas para *Neospora caninum* em relação ao total de amostras processadas entre os anos de 2003-2006.



Gráficos 3, 4, 5 e 6 - Distribuição das amostras processadas e positivas para *Neospora caninum* em cada ano respectivamente, em porcentagem:

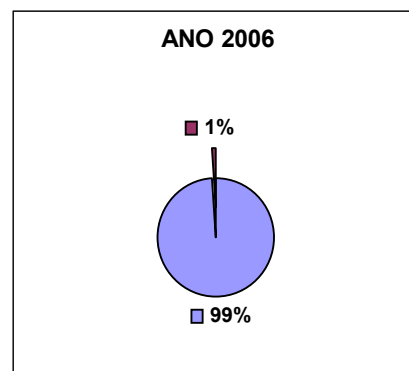
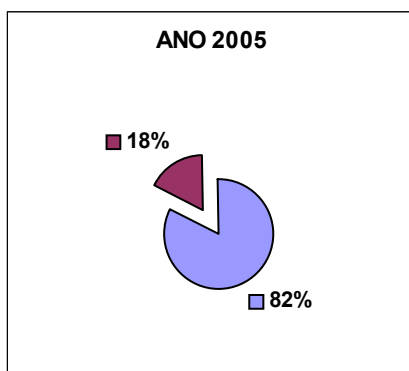
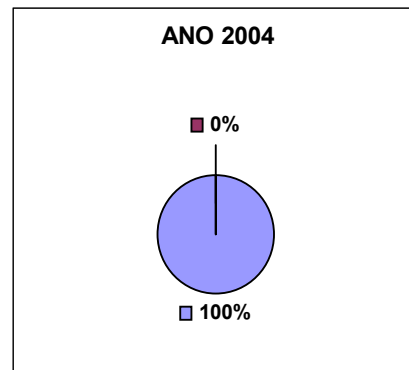
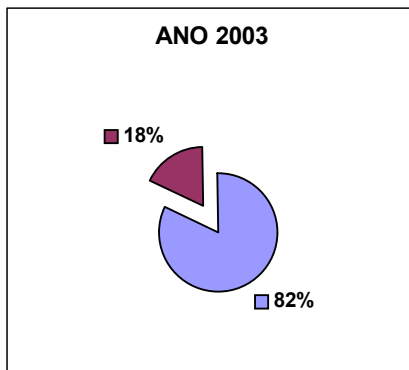


Tabela 4 – Relação das amostras positivas para *Neospora caninum* com idade, raça, município, nos anos de 2003-2006:

ANO	IDADE (MESES)	RAÇA	MUNICÍPIO
2003	14	SRD	RONDON
2003	3	SRD	JACAREZINHO
2003	18	CANCHIM	IBIPORÃ
2003	146	SIMENTAL	GUARAPUAVA
2005	39	HPB	CASTRO
2005	36	NELORE	LONDRINA
2005	7	NELORE	CONGONHINHAS
2005	72	MESTIÇA	TOMAZINA
2005	48	JERSEY	JAGUARIAÍVA
2005	18	NELORE	JOAQUIM TÁVORA
2005	84	SRD	MERCEDES
2005	145	NELORE	CIDADE GAÚCHA
2005	60	GIROLANDA	RIBEIRÃO CLARO
2005	168	PARDO SUÍÇO	CASTRO
2005	156	PARDO SUÍÇO	CASTRO
2005	150	PARDO SUÍÇO	CASTRO
2005	140	PARDO SUÍÇO	CASTRO
2005	48	HOLANDESA	TOLEDO
2005	7	MESTIÇA	MAL. CDO. RONDON
2005	66	HOLANDESA	ARAPOTI
2005	18	SRD	JAGUARIAÍVA
2005	168	SIMENTAL	QUINTA DO SOL
2005	24	MESTIÇA	LAPA
2005	22	SRD	RIO BRANCO DO SUL
2005	FETO	HOLANDESA	CASTRO
2005	4	MESTIÇA	LAPA
2005	40	SRD	PATO BRAGADO
2006	36	HOLANDESA	MARIA HELENA

Figura 4 – Mapas do Estado do Paraná com a distribuição das amostras processadas (amarelas) e das amostras positivas (vermelhas) para *Neospora caninum* (entre 2003-2006):

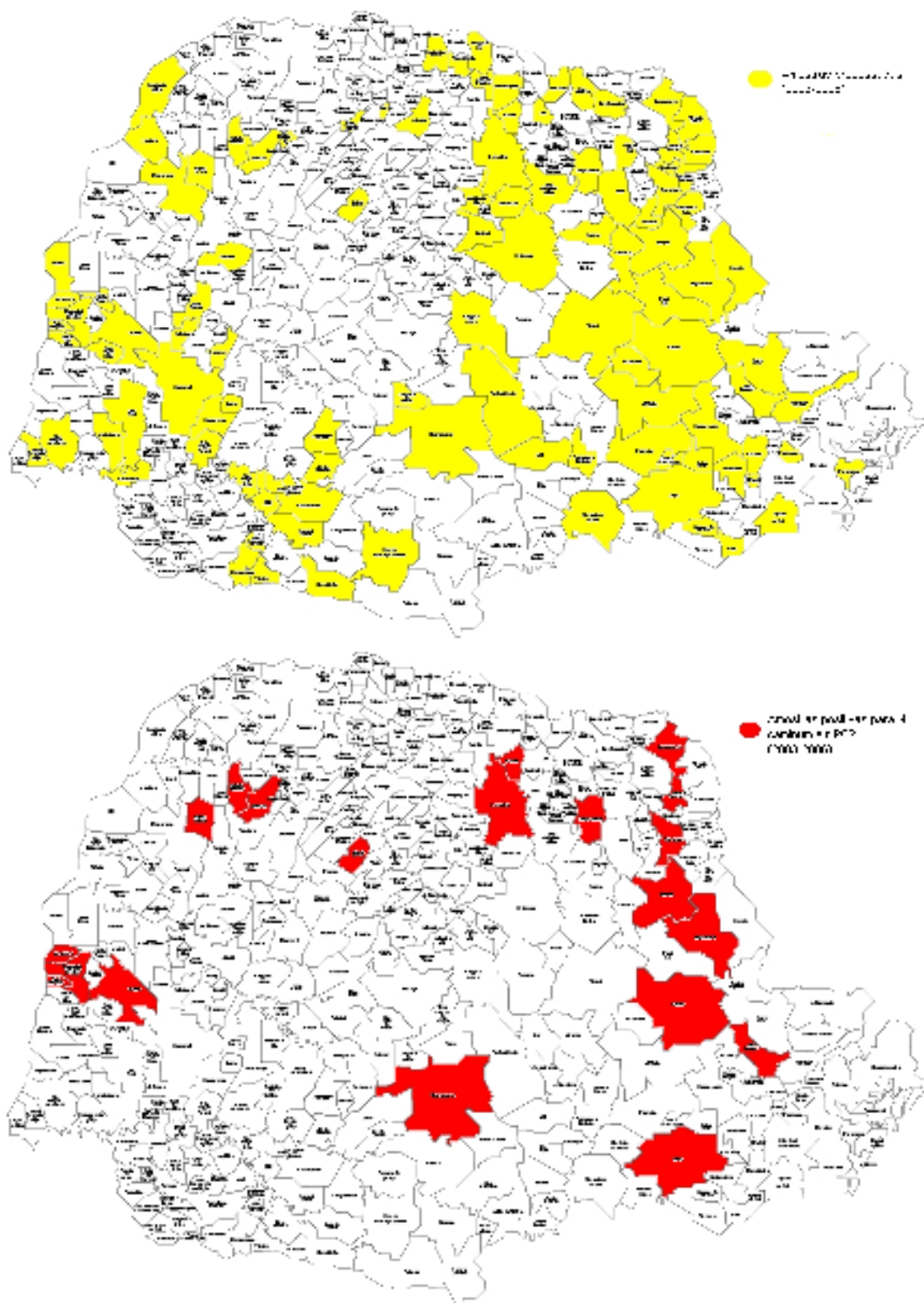


Figura 5 – Gel de agarose com produtos de PCR para *Neospora caninum* de encéfalos de bovinos com sinais neurológicos, utilizando iniciadores Np6 e Np21 que produzem bandas aos 328 pares de base:

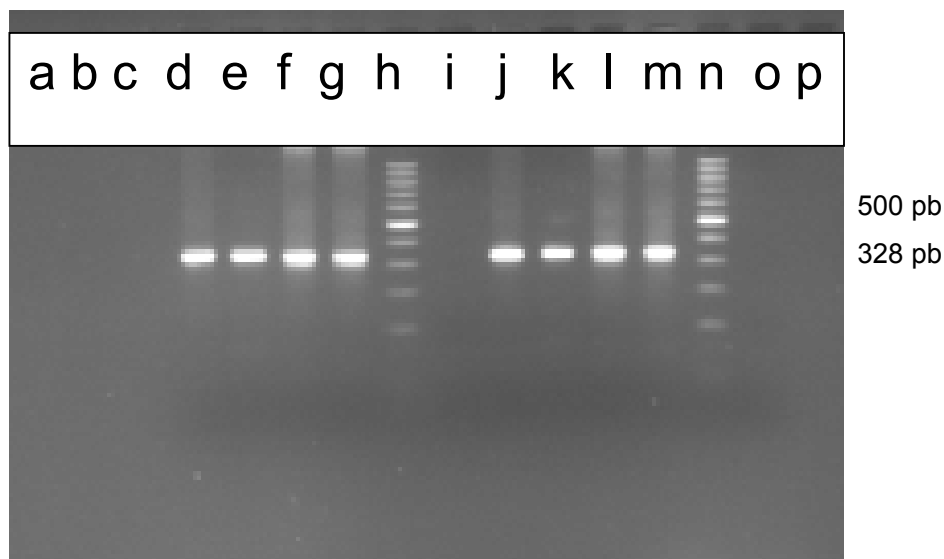


Figura ilustrativa: onde - *a, b, c, o e p* - amostras negativas; *d, e, f, g, k, l e m* - amostras positivas; *h e n* – Marcador molecular com intervalo de 100 pb; *i* – branco; e *j* – controle positivo para *Neospora caninum* NC-1.

Tabela 5 – Número de amostras positivas para *Neospora caninum* por ano e por faixa etária (meses):

ANO 2003		ANO 2004		ANO 2005		ANO 2006	
IDADE	AMOSTRAS	IDADE	AMOSTRAS	IDADE	AMOSTRAS	IDADE	AMOSTRAS
0 A 12	1	0 A 12	0	0 A 12	4	0 A 12	0
12 A 24	2	12 A 24	0	12 A 24	4	12 A 24	0
24 A 36	0	24 A 36	0	24 A 36	1	24 A 36	1
> 36	1	> 36	0	> 36	14	> 36	0
TOTAL	4	TOTAL	0	TOTAL	23	TOTAL	1

Gráfico 7 – Distribuição das amostras de encéfalo de bovino positivas para *Neospora caninum* por ano e por faixa etária:

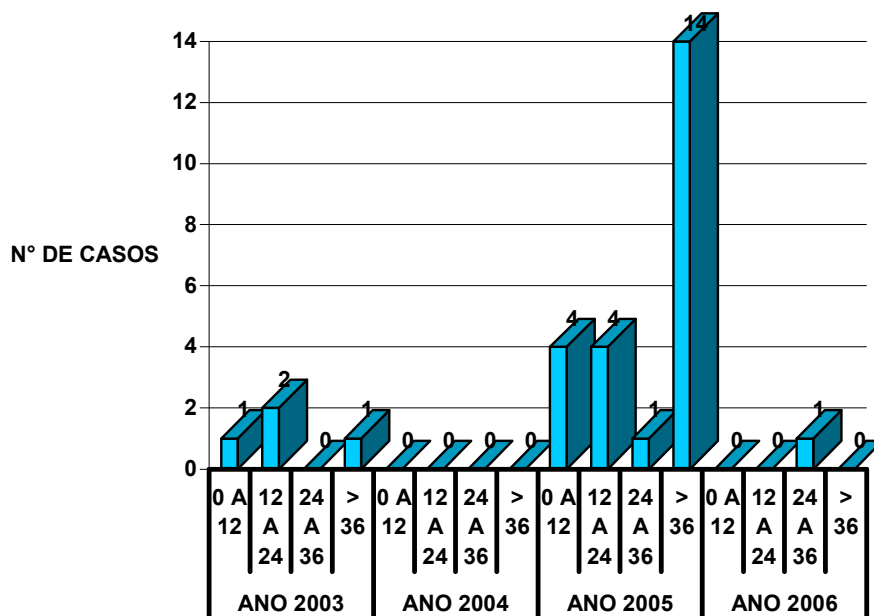
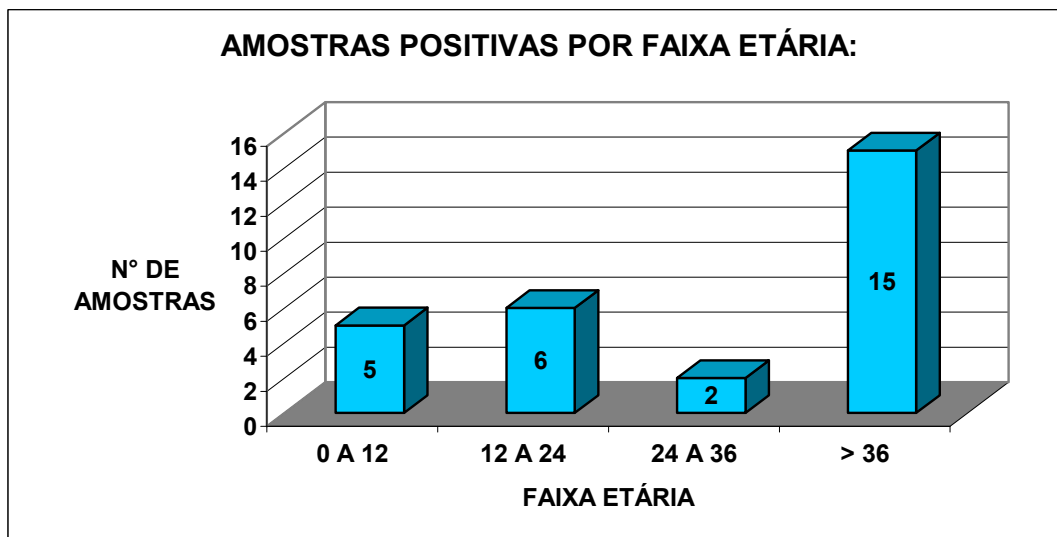


Gráfico 8 – Distribuição do total das amostras positivas para *Neospora caninum* por faixa etária:



4.4 - DISCUSSÃO

O *Neospora caninum* foi encontrado nos encéfalos de bovinos, demonstrando que o parasita circula nos rebanhos paranaenses em várias regiões do Estado, nas diferentes: faixas etárias, tipos de cultura (corte e/ou leite).

Nesse estudo observou-se que o *Neospora caninum* está presente nos animais adultos com sinais neurológicos. A neosporose em sua forma clássica causa abortamento em bovinos de leite e de corte, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes. As vacas de todas as idades podem abortar, dos três meses de gestação até a termo, porém, a maioria dos abortamentos ocorre entre o quinto e sexto mês de gestação. Os fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, nascerem mortos, nascerem vivos com sinais clínicos, nascerem vivos e clinicamente normais, mas infectados (THURMOND & HIETALA, 1995). A probabilidade de abortamento é maior nas vacas com anticorpos anti-*Neospora caninum*, do que nas vacas soronegativas (THURMOND & HIETALA, 1997; MOEN *et al.*, 1998).

O parasita foi encontrado no cérebro de bovinos seu local de encistamento. O *Neospora caninum* encista-se no tecido nervoso (cérebro, medula espinhal, cerebelo, nervos), na retina e em músculo esquelético. Em fetos bovinos, os cistos são encontrados principalmente no cérebro. Nos bezerros com neosporose congênita, os cistos localizam-se no cérebro e na medula espinhal (LINDSAY & DUBEY, 1990). As lesões microscópicas podem estar presentes em muitos órgãos, mas são mais comuns no SNC, coração, fígado; lesões neurais estão presentes na medula espinhal e no cérebro e consiste de encefalomielite não-supurativa. (DUBEY & Schares, 2006). Considerando-se que o *Neospora caninum* foi encontrado em

cérebro de bovinos com sinais neurológicos sugere-se que animais nascidos vivos e clinicamente normais, mas infectados poderiam em um estado imunológico debilitado vir a apresentar um quadro neurológico na idade adulta.

Os outros sinais clínicos, além dos abortamentos, foram relatados em bezerros com menos de quatro meses de idade. A infecção fetal por *Neospora caninum* pode causar anormalidades no sistema nervoso dos bezerros, caracterizando a neosporose clínica (VIANNA, 2004).

No Brasil, o protozoário *Neospora caninum* foi isolado de cão na Bahia (GONDIM *et al.*, 2001); de feto bovino e de bezerro com cegueira congênita no Paraná (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; 2004); de búfalo em São Paulo (RODRIGUES *et al.*, 2004) e de ovino em São Paulo (PENA *et al.*, 2007), no entanto não se tem relato de pesquisa em animais adultos.

Das 253 amostras processadas, 28 foram positivas para *Neospora caninum*, e sendo quase na totalidade de bovinos adultos, uma prevalência de 11,07%. Existem apenas dois estudos que verificaram a presença de *Neospora caninum* em animais adultos por isolamento (SAWADA *et al.*, 2000; OKEOMA *et al.*, 2004), no Japão e Nova Zelândia respectivamente.

No Brasil, o diagnóstico é feito principalmente em fetos, não considerando o parasita como causa de doença neurológica em bovinos adultos.

Nesse estudo, os bovinos positivos para *Neospora caninum* foram encontrados em diversos municípios dispersos por todas as regiões geográficas do Paraná (figura 4). O primeiro isolado de bovino no Paraná foi de feto e bezerro com sinais neurológicos de uma região de gado de leite (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; 2004); observou-se nesse estudo que os casos positivos corroboram com os

dados que o parasita predomina nestas regiões, denominadas de bacias leiteiras do Estado, possivelmente por uma maior concentração de animais.

Sobre a neosporose nos animais adultos, existe grande escassez de informações e o *Neospora caninum* não foi ainda identificado em secções histológicas de tecidos de bovinos com mais de dois meses de idade; porém, o parasita foi isolado de bovino adulto por SAWADA *et al.*, em 2000. O *Neospora caninum* foi isolado no Japão, de uma vaca adulta de dois anos de idade, que havia abortado fetos infectados por este agente em duas ocasiões, e que apresentou um título pela técnica de imunofluorescência indireta de 1:1600 para *Neospora caninum*. A vaca foi a óbito vinte e quatro dias após o segundo abortamento e o isolamento foi realizado utilizando camundongos nude, e posteriormente em cultivo de células Vero. Os taquizoítas purificados foram obtidos dos cultivos e foi processada a técnica de PCR, amplificando a seqüência específica de DNA para *Neospora caninum* (SAWADA *et al.*, 2000).

O segundo caso de isolamento de *Neospora caninum* em vaca adulta, foi na Nova Zelândia. Uma vaca, com mais de dois anos de idade, apresentou-se desde os 150 dias de gestação até o final, com anticorpos persistentes. A vaca e seu bezerro, com dois dias de idade, foram mortos e se obteve o isolamento de *Neospora caninum* de ambos, inclusive a vaca apresentou anticorpos pré-colostrais, porém ambos foram assintomáticos (OKEOMA *et al.*, 2004).

Os dois casos de isolamento em animal adulto (SAWADA *et al.*, 2000 e OKEOMA *et al.*, 2004) são estudos que apresentam extrema importância devido à riqueza de informações e gerando novas pesquisas.

4.5 – CONCLUSÃO

A realização do diagnóstico de neosporose em bovinos com quadro neurológico pela técnica de PCR indica a importância de incluir a pesquisa da presença e suas consequências como agente patológico nos encéfalos dos animais para posterior indicação como diagnóstico diferencial de encefalopatias em bovinos.

Os animais que apresentarem sinais neurológicos com diagnóstico de raiva negativo devem ser pesquisados para a presença de *Neospora caninum*, que até então, não era considerado de importância nestes casos por ser um agente de descoberta recente, com poucos relatos para animais acima de seis meses de idade (bezerros) apresentando doença neurológica.

REFERÊNCIAS

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1-34. 2006.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESÚS, E. E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNÁNDEZ, H.S.; ALMEIDA, M.AO; 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, n. 1, p. 1-7. 2001.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 410-413, 1990.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.B.T.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; DE SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, n. 153, p. 366-367. 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VAN DER VINNE, R.; PINCKNEY, R.D. Isolation de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109. 2004.

MOEN, A. R., WOUDA, W., MUL, M. F., GRAAT, E. A. M, van WERVEN, T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. **Theriogenology**. n. 49; p. 1301-1309. 1998.

OKEOMA, C. M.; WILLIAMSON, N. B.; POMROY, W. E.; STOWELL, K. M.; GILLESPIE, L. M. Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. **Veterinary Journal** n° 52, p. 364-370. 2004.

RODRIGUES, A. A. R., GENNARI, S. M., AGUIAR, D. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., VIANNA, M. C. B., DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**. V. 124; p. 139-150. 2004.

RODRIGUES, A. A. R., GENNARI, S. M., AGUIAR, D. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., VIANNA, M. C. B., DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**. V. 124; p. 139-150. 2004.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from brain a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 247-252, 2000.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide iniciadores for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally

infected nude mice by the polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279. 1996.

THURMOND, M., HIETALA, S., Strategies to control *Neospora* infection in cattle. **Bovine Practical**. n. 29; p. 60-63. 1995.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**. n. 58, p. 1381-1385.1997.

VIANNA, L.C. Ocorrência e transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em novilhas prenhes. 2004. 52 fl. **Tese** (doutorado) em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2004.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Seguindo o objetivo desta dissertação encontramos muitas respostas e também encontramos algumas questões a serem pesquisadas. Os dados encontrados neste estudo demonstram que o *Neospora caninum* está presente em encéfalos de bovinos que vão a óbito com sinais neurológicos numa taxa de 11,07% dos casos.

5.1 – PERSPECTIVAS

Estamos certos de que são necessárias novas e mais aprofundadas pesquisas com relação a este protozoário e suas conseqüências.

Deve-se ressaltar a importância da realização de pesquisas para se estabelecer os locais de maior concentração dos cistos de *Neospora caninum* no encéfalo bovino, para então se obter maior êxito nas técnicas de isolamento ou detecção deste agente. Em outras doenças neurológicas, como exemplo a raiva, os tecidos de maior concentração do vírus são conhecidos, conforme menciona a tabela 6 (Anexos).

A obtenção das correlações entre: título alto, abortamentos, seguidos de óbitos apresentando ou não quadro neurológico e a presença de *Neospora caninum* no encéfalo destes animais é outra questão a ser pesquisada.

Concluimos então, que o *Neospora caninum* tem sua importância, em nosso Estado, como possível causa de óbito entre os bovinos com sinal neurológico, independente de sua faixa etária, raça, e/ou localização geográfica. A sugestão é que o parasita seja incluído como diagnóstico diferencial para as doenças neurológicas.

ANEXOS

1. SOLUÇÕES E TAMPÕES

A água utilizada nos procedimentos de biologia molecular para preparo de soluções e tampões foi a Ultrapura (Milli Q), autoclavada e fracionada em alíquotas de no máximo 1 mL.

Todas as etapas de preparo, fracionamento, soluções, tampões foram realizadas em cabine de fluxo laminar.

1.1 Solução A

TRIS 10 mM

NaCl 150 mM

Ajustado o pH para 7,4 com HCl, filtrada em filtro 0,22 μ m e armazenada em geladeira 2 a 8°C.

1.2 Tampão de lise (TE)

TRIS HCL 10 mM

EDTA Na₂ 1 mM

pH 8,0

1.3 Preparo do Tris 2M (pH 7,4)

850mL H₂O Milli Q

242,2g tris base

75mL de HCl (para 250mL de Tris – 28mL HCl fumigante)

Adicionado o HCl concentrado com agitação suave até atingir pH 7,4, foi adicionada água para 1000mL, e aliqotado em frascos de 100mL e autoclavado. E estocado em geladeira 2 a 8°C.

1.4 Preparado o Tris 2M (pH 8,0) - para elaboração do fenol saturado

850mL H₂O Milli Q

242.2g Tris base

HCl (para 100mL – 4mL de HCl)

Adicionado o HCl concentrado com agitação suave até atingir pH 8,2, e adicionada a água até 1000mL. Foi aliqotado em frascos de 100mL e autoclavado.

1.5 Preparo EDTA 0.5M

Em um Becker com 300mL de água ultrapura Milli Q acrescentado de 93.5g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Misturado até completa dissolução e adicionado NaOH 10N para atingir pH 8,0, e acrescido ainda de 500mL de água ultrapura. Foi aliqotado em frascos de 50 a 100mL e autoclavado. Estocado em geladeira 2 a 8°C.

1.6 Preparo do SDS (Sódio Dodecil Sulfato) 10%

100g de SDS

1000mL de água ultrapura.

Homogeneizado com cuidado até a dissolução completa, e armazenado em frasco estéril, e estocado em temperatura ambiente.

1.6 Preparo da Proteinase K

Concentração para extração de DNA : 100mg/mL. Dissolvido o conteúdo do frasco em 1,0mL de água ultrapura, foi aliqotado em tubos estéreis de 1.5mL em alíquotas de 100 μ L e estocado em freezer à temperatura de 20°C negativos.

1.7 Preparo da Solução de Fenol Saturado (em capela de exaustão)

Foi solubilizado o fenol, aquecendo o frasco em Banho Maria, a 62°C (+/- 2°C) e preenchido com TRIS 500mM (pH 8,0), sendo na proporção de uma parte de TRIS (62,25 mL) e duas partes de fenol (125 mL). Foi misturado durante quinze minutos esperando decantar em temperatura ambiente. Esperou-se pela separação de fases, quando a solução estivesse bifásica. Foi retirado o sobrenadante, saturado novamente o fenol com Tris 100 mM (pH8) até que o pH da fase fenólica (fase inferior), fosse igual ou superior a 7,6. Foi então adicionado de 0.2% de *Beta* - mercapto - etanol (0,25 mL), e o volume

final de fenol geralmente foi de 125 mL. Repousou por cerca de 16 horas a 4°C e acondicionado em frasco âmbar (abrigo da luz).

1.8 Preparo do tampão TE (TRIS-EDTA) 1X

Para um volume de 100mL usou-se o seguinte cálculo TRIS 10mM pH 7,4; equivalendo a 0,5 mL da solução estoque, e EDTA 0,1mM pH 8,0; equivalendo a 20 µL da solução estoque e acrescido de 99,3 mL de água ultrapura.

1.10 Preparo de Gel de Agarose Sódica 1,4%

Pesou-se 0,91g de agarose sódica em balança analítica e adicionou-se de 70mL de tampão TBE 1X, foi adicionada também de 30 µL de Brometo de Etfídio na diluição 1: 10.000, após completa dissolução do ágar em microondas.

1.11 Preparo do tampão TBE (TRIS/ÁCIDO BÓRICO/EDTA) 20X

121,0g	TRIS Base (1M)
6,7 g	Ácido Bórico (1 M)
7,4 g	EDTA – Na ₂ 2H ₂ O (20mM)
1000 mL	Água ultrapura (q.s.p.)

1.12 Preparo do tampão TBE (TRIS/ÁCIDO BÓRICO/EDTA) 1 X

50 mL de TBE 20X (solução estoque) mais q.s.p. 1000 ml de água ultrapura.

Preparo do Corante B.P.B (Azul de Bromo fenol ou Bromo Phenol Blue) 10%

5 g de Azul de Bromo fenol
50 mL de água ultrapura

1.14 Preparo de X.C. (Xylene Cyanol / Xileno Cianol) 10%

5 g de Xileno Cianol
50 mL de H₂O Milli Q.

1.15..Preparo da Solução de Bromo Phenol Blue / Xileno Cianol

Aliquotada em partes iguais (v/v) em frasco estéril , o BPB + XC (10%).

1.16 Preparo do corante Brometo de Etídio (BE)

Foi preparado na concentração de 10mg/mL, manipulado sempre com luvas de procedimento , em cabine de fluxo laminar , 0,2 g de Brometo de Etídio e 20 mL de H₂O Milli Q. Misturado até completa dissolução e estocado em frasco âmbar a temperatura ambiente.

1.17 Tampão TAE – Tris acetato na solução concentrada 50x

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 mL
q.s.p.	1000 mL

Mantido em geladeira e no momento do uso diluído para 1x, com água destilada. A solução uso apresenta as concentrações 0,04 M de Tris acetato e 0,001 M de EDTA.

2 Extração de DNA (Método Clássico – fenol/Clorofórmio/Etanol)

2.1 De parasitas em cultivo celular

Com a finalidade da lise da parede celular, foi utilizado o sedimento de parasitas em tubos com capacidade de 2 mL com capacidade para 2 mL, e para um volume de 50 a 100 mg de sedimento de parasitas foram adicionados 400 µL de tampão de lise (TE), e adicionado o dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% (0,5% no mínimo) do volume final (solução mãe de SDS foi preparada a 10%); quando então, foram incubados durante 2 horas com RNase (200 µg/mL do volume final), em banho-maria a temperatura de 37°C e adicionados de Proteinase K para uma

concentração final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Incubados por 2 horas ou durante a noite (cerca de 16 horas) a 55°C, em banho-maria com agitador magnético.

2.2 Extração de DNA das amostras de encéfalo bovino

Para o preparo das amostras para a utilização da tripsinização dos encéfalos, primeiramente foram pesados de 100 a 110 mg da amostra, e adicionadas de 500 μL de tripsina 0,25%, depois foram homogeneizadas em agitador durante a noite (cerca de 16 horas) a 4°C (geladeira), e então congelados a 70 ° negativos. Descongelados em geladeira e centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos.

Depois foram ressuspendido o *pellet* (células/parasitas) conforme citado abaixo:

TRIS 2 M (BASE)	10 μL
EDTA 0,5 M	10 μL
SDS 10%	40 μL
PROTEINASE K (10 mg/mL)	40 μL
ÁGUA ULTRAPURA	800 μL

E incubados com o tampão de lise celular contido no tubo a 37°C durante a noite (cerca de 16 a 24 horas), com agitador magnético.

Desproteínização do DNA – em seguida fora realizada a extração de DNA por método Clássico: Fenol /Clorofórmio / Etanol. A suspensão foi adicionada de 500 μL de solução tamponada de fenol, homogeneizada em agitador de tubos (vortex) por 5 a 10 segundos e centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos, e transferido o sobrenadante para um novo tubo plástico cônicos com capacidade para 2 mL e adicionando à suspensão, 500 μL de solução tamponada de fenol, homogeneizada em agitador de tubos por 5 a 10 segundos e centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos, novamente fora adicionado à suspensão, 500 μL de solução tamponada de fenol, homogeneizada em agitador de tubos por 5 a 10 segundos e então centrifugada a 13.000 rpm durante 10 minutos.

Foi realizada esta etapa com solução fenólica, em capela de exaustão e transferida a fase líquida superior (contendo o DNA) para um novo tubo de plástico cônico com capacidade para 1,5mL, contendo de 1 a 2 volumes de clorofórmio (previamente resfriado a cerca de 20°C negativos), homogeneizando e após foi centrifugado por cerca de 13.000 rpm durante 10 minutos e transferida a fase líquida (contendo o DNA) – fase superior para um novo tubo plástico cônico com capacidade de 1,5mL.

Precipitação do DNA – foi adicionado cerca de 800 a 900 μ L de etanol absoluto (previamente resfriado a cerca de 20°C negativos) e invertido o tubo com cuidado para que o DNA precipitasse, mantendo o DNA a 20°C negativos durante a noite (cerca de 16 a 24 horas), ou prosseguindo após 4 horas a 20°C negativos, centrifugando o tubo a 10.000 rpm durante 30 minutos; quando então foi desprezado o álcool, e ressuspendido o precipitado de DNA com etanol 70% (0 a 2°C). Foi centrifugado novamente a 10.000 rpm por 15 minutos, e novamente desprezado o álcool, deixando o tubo invertido sobre o papel filtro para que o precipitado de DNA ficasse seco. (fazendo duas vezes a lavagem com o etanol frio). Deixando secar na estufa 37°C por 15 minutos e observada a secagem do tubo, foi ressuspendido o precipitado de DNA com tampão TE 1X (100 μ L). Incluindo a RNase na concentração de 10 μ g/mL de TE (Cheung, 1993), o DNA a ser utilizado para PCR foi diluído em TE. O DNA de reserva foi estocado em freezer 70°C negativos e devidamente mapeado para rastreabilidade e análises posteriores.

3 Amplificação do DNA

Na PCR foi usado um *mix* de acordo com a solução especificada na Tabela 2, capítulo 4. O volume da reação foi de 30 μ L, sendo 9,5 μ L de *mix*, 3 μ L de DNA e 17,5 μ L de água ultrapura estéril.

Distribuídas as alíquotas de 17,5 μ L de água ultrapura estéril e acrescidos dos 3 μ L de DNA das amostras e controles positivos nos tubos de plástico cônico com capacidade para 0,5 mL para PCR, foi homogeneizado cada tubo após colocar a amostra, em agitador de tubos por dois segundos, e reservadas em

geladeira. Quando então foi preparado o *mix* em cabine de fluxo laminar, conforme o número de amostras de DNA, considerando o tubo branco e os controles positivos. Foram adicionados os componentes da reação em um tubo de plástico cônico com capacidade para 2,0 mL, na seqüência apresentada, e adicionada por último a enzima *Taq* DNA polimerase. Foram mantidos os reagentes e o *mix* em banho de gelo. Preparado um tubo branco (20,5 µL água ultrapura estéril e 9,5µL do *mix*). E homogeneizado o *mix* no tubo de plástico cônico com capacidade para 2,0 mL em agitador de tubos por 30 segundos.

3.1 Água ultrapura

A água ultrapura foi preparada anteriormente a sua utilização por filtro 0,22µm, e fracionada em fluxo laminar em alíquotas de 500 µL, em tubos com capacidade de 2 mL que foram autoclavados e mantidos em freezers 20°C negativos até sua utilização.

3.2 Tampão de amplificação 10x

O tampão foi adquirida da Invitrogen Brasil, com 200 mM de TRIS-HCl pH 8,4 e 500 mM de KCl, sem o Cloreto de Magnésio e fora mantido em freezer 20°C negativos. (PCR Buffer 10X invitrogen Brasil lote n° TM 581^a).

3.3 Cloreto de Magnésio

Também adquirida da Invitrogen Brasil, a 50 mM.

3.4 Mistura de nucleotídeos – dNTP mix

Os quatro nucleotídeos, dATP, dCTP, dGTP e dTTP, adenosina, citosina, guanina e timina, respectivamente; foram adquiridos da empresa *eppendorf* (made in Germany) na concentração de 100 mM e pH 7,0; permaneceram estocadas em freezer a 20°C negativos até o momento do seu preparo na concentração de 2,5 mM para cada dNTP e alíquotadas em pequenos volumes 50 µL e novamente estocadas em freezer 20°C negativos até o momento de seu uso.

3.5 Iniciadores Np6 e Np21

Os iniciadores foram adquiridos da invitrogen Brasil, e sua apresentação era liofilizada e foram preparadas soluções estoque, na concentração de 200 μM . E desta; foram preparadas soluções de trabalho a 10 μM . Estas soluções foram aliquotadas e mantidas em freezer 20°C negativos.

3.6 Taq DNA Polimerase

Foi adquirida da Invitrogen Brasil (Recombinant Invitrogen - lotes n°s: SD251c e SEYB1h) na concentração de 5 U/ μL e estacada em freezer 20°C negativos, esta sempre foi acrescida por último, permanecendo naquele até o momento de sua utilização.

3.7 Protocolo para amplificação em termociclador (marca Eppendorf)

Foram processadas as amostras conforme Yamage *et al.*, 1996:

94°C	5 minutos	1 ciclo	
94°C	1 minuto	} 40 ciclos	
50°C	1 minuto		
74°C	3 minutos e 30 segundos		
72°C	5 minutos	1 ciclo	
4°C	30 minutos para extensão final.		

Os produtos desta foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,4%.

4. Eletroforese em gel de agarose 1,4% (Gel de agarose/SIGMA)

Foi preparado o gel de agarose a 1,4%, em 70 mL de tampão TAE 1x, por cerca de 1 minuto e 30 segundos em potência alta de microondas. E quando atingia cerca de 40°C era acrescido de brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do gel e misturava-se bem, era colocada na cuba com os pentes e após sua polimerização, eram acrescentados de tampão TAE 1x e só então eram retirados

os pentes do gel com muito cuidado e então a cuba de acrílico com a agarose polimerizada e já sem os pentes eram emergidos em tampão na cuba propriamente dita. Só então eram distribuídas as alíquotas de 2 μ L de azul de bromofenol sobre uma placa de hemobag recortada em número idêntico aos das amostras a serem corridas na agarose e acrescidas das amostras (13 μ L) e após misturar com micropipetador e ponteiros apropriadas eram aplicadas nos pocinhos correspondentes do gel, iniciando com o marcador de pares de bases (1kb). Após isto feito era acrescida a cuba o restante do tampão TAE 1x (150 mL e colocada sua tampa, em cuja eram conectados os cabos da fonte de eletroforese a 80 volts, migrando do pólo negativo (preto) para o positivo (vermelho). Era desligado após migração de 2/3 da cuba e retirado o gel era analisado em Sistema de fotodocumentação (Marca: Vilber Lourmat, modelo: DOC – Print – (“DP 001 FDC”), composto de transiluminador de ultravioleta e fotografada com a máquina de captação de imagem através de disquete, para posterior arquivamento em computador para serem trabalhadas e arquivadas em programa de fotos como Photo Editor (Microsoft) ou algum similar.

A fonte de eletroforese utilizada foi a HU 10 – para 450 mL de tampão, para gel com 70 mL e aproximadamente 5 mm de espessura e 15 μ L de volume em cada pocinho. Os marcadores ou Ladders utilizados foram Invitrogen (600) e Promega (500) 100pb-DNA Ladder estocados a 20°C negativos.

Tabela 6 – Índice de positividade do teste de Imunofluorescência direta (IFD) para pesquisa de vírus rábico nos diversos segmentos do Sistema Nervoso Central (SNC):

AMOSTRAS DO SNC	% DE POSITIVIDADE NA IFD
Medula	100
Ponte	100
Tálamo	100
Hipocampo	95,9
Cerebelo	88,9
Córtex frontal	67,6
Córtex lateral	76,7
Córtex caudal	63,9

BINGHAM, J.; VAN DER MERWE, M. Distribution of rabies antigen in infected brain. Material: Determining the reliability of different regions of brain for rabies fluorescent antibody test. **Journal of Virological Methods**, v. 101, p. 85-94, 2002.

VITA

Maria Aparecida de Carvalho Patrício nascida em Salto do Itararé, no Estado do Paraná, em 17 de maio de 1965. Teve toda sua formação acadêmica na Universidade Federal do Paraná, onde se formou, em 1990, no Curso de Medicina Veterinária, Em 1995, concluiu curso de Especialização em Bovinotecnia e Patologia Bovina; e em 2008, apresentou dissertação para obtenção de título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Trabalhou inicialmente em Vigilância Sanitária no município de Salto do Itararé de meados de 1990 a meados de 1991; e ainda no ano de 1991 foi contratada através de concurso público pela Companhia de Desenvolvimento Agropecuário do Paraná – CODAPAR, onde trabalhou com programa de desenvolvimento pecuário como Tração Animal, Inseminação Artificial, Centros de Produção Regionais, Ovinocultura, Transferência de embriões, todos voltados para o pequeno e médio agricultor; em 1993, passou a trabalhar no Centro de Diagnóstico ‘Marcos Enrietti’ pertencente à Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná, onde desde então é responsável técnica pelos diagnósticos de Raiva dos herbívoros, Doença de Aujeszky em suínos e Anemia Infecciosa dos Eqüídeos.