



**Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica**

LAÍS DE MELO MILANI

**CONFEÇÃO DE LÂMINAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA
PARA DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE BOVINA**

**CURITIBA
2010**

LAÍS DE MELO MILANI

**CONFECÇÃO DE LÂMINAS DE IMUNOFLORESCÊNCIA PARA
DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE BOVINA**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Patologia Básica do curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora interna: Prof^a Dr^a Márcia Kiyoe Shimada

Orientador externo: Jorge Victor Bacila Agottani

CURITIBA
2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Vera e Mário pelo incentivo constante e por sempre terem priorizado a minha educação, apesar de todas as dificuldades.

Ao meu orientador Jorge Agottani que permitiu a minha entrada na Divisão de Antígenos do TECPAR. À Tânia Penha e ao Krüger pela enorme paciência e disposição em ensinar o que era preciso. À Gisele pela confiança, companhia e orientação que sempre estiveram presentes, apesar de muitos erros meus. Agradeço a todos os funcionários da Divisão de Antígenos do TECPAR pela disposição e ajuda no preparo de soluções, meios e materiais.

Agradeço a Professora Doutora Rosângela Locatelli pela disposição, ensinamentos e dedicação que teve ao longo de todo esse tempo. Obrigada pela paciência e por ter nos ajudado a abrir os olhos, agora eu sei que não são bactérias!

Agradeço imensamente a minha orientadora interna Professora Doutora Márcia Shimada por ter me acolhido em um momento que muitos fecharam as portas. Obrigada pela dedicação, apoio e confiança.

Ao meu namorado Bruno pelos momentos felizes e por me ajudar a seguir em frente me aturando mesmo em horas difíceis.

Aos colegas e amigos que estiveram por perto, ajudando e compartilhando bons momentos. Vocês tiveram um papel importante na minha vida. Obrigada pelo apoio.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

A neosporose, causada pelo *Neospora caninum*, é uma doença emergente que provoca distúrbios neurológicos, abortamentos e mortalidade de neonatos. É um dos principais parasitos causadores de abortamentos em bovinos no mundo e, portanto, havendo necessidade de realizar triagens nos rebanhos para detecção de animais infectados. O diagnóstico é baseado no histórico do rebanho, sinais clínicos e resultados de exames laboratoriais como a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA) que são técnicas sorológicas mais rotineiramente utilizadas para identificar animais infectados pelo *N. caninum*. Em virtude dessa importância da utilização de técnicas sorológicas o TECPAR viu a necessidade de desenvolver kits de diagnósticos nacionais baseados na técnica de IFI. Para a confecção das lâminas há necessidade de padronização de todas as etapas para comercialização, visando procedimentos que possam ser facilmente reproduzidos. Inicialmente, este trabalho visou desenvolver meios para obtenção de *N. caninum* a partir de cultivo *in vitro* e manutenção *in vivo* para a confecção das lâminas. O cultivo do parasito foi estabelecido de forma adequada em uma nova cepa de células VERO após tentativas de adaptação com outra cepa. Além disso, a manutenção *in vivo* em gerbil, um modelo animal adequado para o *Neospora caninum*, permitiu a obtenção de grande quantidade de taquizoítas viáveis. A técnica de congelamento de *N. caninum* com BSA 1% não foi satisfatória, pois a lâmina confeccionada a partir do estoque congelado apresentou muitos *debris* celulares e a fluorescência, utilizando um soro controle positivo, apresentou-se fraca. As lâminas, que foram confeccionadas a partir de taquizoítas retirados do cultivo celular, apresentaram melhor qualidade em relação as que foram confeccionadas com taquizoítas descongelados do BSA, apresentaram fluorescência mais evidente e menor quantidade de *debris* celulares. Desta forma, ainda é necessário desenvolver uma padronização para o armazenamento, para que seja possível a retirada dos taquizoítas diretamente do estoque para a confecção das lâminas para comercialização, eliminando a etapa de cultivo em garrafas toda vez que necessitar fabricar um lote de lâminas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Neospora caninum</i>	6
2.2 HOSPEDEIROS	8
2.3 CICLO DE VIDA DE <i>Neospora caninum</i>	9
2.4 FORMAS DE INFECÇÃO	11
2.4.1 Transmissão horizontal	11
2.4.2 Transmissão vertical	11
2.4.3 Infecção lactogênica	12
2.5 SINAIS CLÍNICOS DE NEOSPOROSE	12
2.5.1 Cães	12
2.5.2 Bovinos	13
2.6 DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE EM BOVINOS	14
2.6.1 Diagnóstico sorológico	15
2.6.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI)	16
2.7 ISOLAMENTO <i>in vitro</i> E <i>in vivo</i> DE <i>Neospora caninum</i>	17
2.7.1 Isolamento <i>in vitro</i>	17
2.7.2 Isolamento <i>in vivo</i>	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.2.1 Determinar um cultivo de <i>N. caninum in vitro</i> e manutenção <i>in vivo</i>	20
3.2.2 Produzir estoques de formas taquizoítas íntegros congelados em soro albumina bovina.	20
3.2.3 Testar as lâminas confeccionadas para a técnica de imunofluorescência	20
4 METODOLOGIA	21

4.1 MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES	21
4.1.1 Cultura <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>N. caninum</i>	21
4.1.2 Congelamento de <i>N. caninum</i> em dimetilsulfóxido (DMSO).....	21
4.1.3 Congelamento de <i>N. caninum</i> com soro albumina bovina (BSA).....	21
4.1.4 Técnica de imunofluorescência indireta	21
4.2 CULTIVO DE <i>N. caninum in vitro</i> E MANUTENÇÃO <i>in vivo</i>	22
4.2.1 Cultivo de <i>N. caninum</i> em células VERO	22
4.2.2 Manutenção de <i>N. caninum</i> em gerbil (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	23
4.3 CONGELAMENTO DE TAQUIZOÍTAS EM DMSO	24
4.4 CONGELAMENTO DE TAQUIZOÍTAS EM SORO ALBUMINA BOVINA.....	24
4.5 CONFECÇÃO DE LÂMINAS DE IFI.....	25
4.6 TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	34
7 REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (MATTOS *et al.*, 2008). O parasito foi identificado pela primeira vez em 1984, na Noruega, em cachorros com paralisia nas patas e em 1989 foi confirmado o primeiro caso de neosporose em bovinos (STENLUND, 2000; DUBEY, 1999). Esse parasito foi primeiramente descrito por Dubey e colaboradores em 1988 e até esta data era erroneamente diagnosticado como *Toxoplasma gondii* que também pertence ao filo Apicomplexa (DUBEY *et al.*, 1988).

A neosporose tem emergido como uma séria doença de cães e bovinos, apresentando como principais problemas na criação de gado os abortamentos e a mortalidade neonatal (DUBEY *et al.*, 2007). A distribuição de *N. caninum* é mundial e na última década o parasito foi identificado como a maior causa de abortos em bovinos leiteiros (STENLUND, 2000). As causas de perdas embrionárias e de feto são amplas, portanto, o desenvolvimento de um diagnóstico confiável com especificidade é importante para adoção correta de medidas de controle para as doenças reprodutivas.

O diagnóstico da doença depende do histórico do rebanho, sinais clínicos e resultados de exames laboratoriais. A detecção de anticorpos específicos é rotineiramente utilizada como indicativo de infecção num animal, sendo a técnica de imunofluorescência indireta a mais utilizada (PARÉ *et al.*, 1995) e considerada a metodologia de referência para *N. caninum*, sendo utilizada como teste padrão para calibração e comparação com os novos testes (ANDREOTTI *et al.*, 2003). Por essas razões e por ser um método considerado mais barato em relação ao teste de ELISA, escolheu-se realizar a confecção de lâminas de imunofluorescência indireta (IFI) para a montagem do kit de diagnóstico da neosporose.

O objetivo do trabalho foi a obtenção de *N. caninum* de cultivo *in vitro* para a confecção, e futura comercialização, de kits de imunofluorescência indireta (IFI) como auxiliar no diagnóstico de neosporose bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Neospora caninum*

O protozoário *Neospora caninum* apresenta uma forma ovóide ou de meia-lua, com o núcleo na posição central ou terminal (Figura 1), apresentando morfologia similar a outros protozoários do filo Apicomplexa como o *Toxoplasma gondii* e o *Sarcocystis* sp.

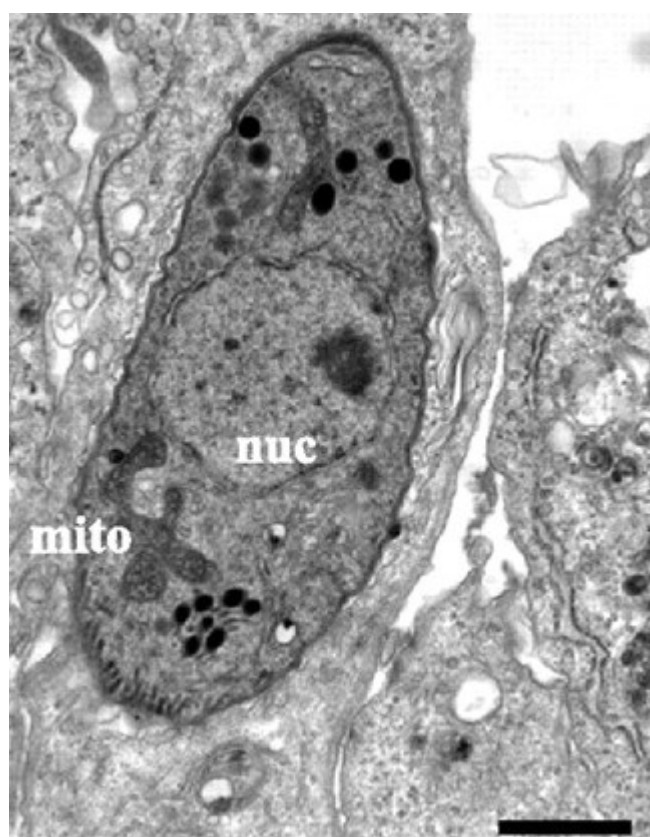


Figura 1: Ultraestrutura do protozoário *N. caninum*. Microscopia eletrônica de transmissão. Mito: mitocôndria, nuc: núcleo. Barra: 0,6 μm . Fonte: LEEPIN *et al.* (2008).

As principais formas conhecidas como estádios infectantes são os oocistos esporulados, formas taquizoítas e cistos teciduais (Figura 2A) contendo os bradizoítas. Taquizoítas e cistos teciduais são estádios intracelulares e são encontrados nos hospedeiros intermediários e definitivos, enquanto os oocistos são liberados apenas pelo hospedeiro definitivo na forma não esporulada (não infectante) (Figura 2B) tornando-se esporulada (infectante) (Figura 2C) após 24 horas no ambiente.

Os taquizoítas apresentam uma forma ovóide, arredondado ou de meia-lua, medindo aproximadamente $6 \times 2 \mu\text{m}$, apresentando núcleo na posição central ou terminal (DUBEY *et al.*, 2007; PLUGGE, 2008). O protozoário nesse estágio tem multiplicação rápida por endodiogenia. Em animais infectados, os taquizoítas podem estar presentes em células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (ANDREOTTI *et al.*, 2003; DUBEY *et al.*, 1988). Essas formas estão localizadas no vacúolo parasitóforo dentro da célula ou livres, e podem se diferenciar em formas bradizoítas formando cistos teciduais, dependendo da resposta imune do hospedeiro (DUBEY *et al.*, 1988).

Os cistos teciduais possuem um formato oval ou redondo medindo até $107 \mu\text{m}$ e a espessura da parede podendo medir até $4 \mu\text{m}$. No interior desses cistos são encontradas as formas bradizoítas medindo em torno de $8 \times 2 \mu\text{m}$. Os cistos são encontrados principalmente no sistema nervoso central e podem persistir no hospedeiro por vários anos sem apresentar sintomas da doença (PETERS *et al.*, 2001).

Os oocistos são esféricos e medem de 10 a 11 μm de diâmetro. Cada oocisto contém um esporonte central na forma não esporulada e dois esporocistos com quatro esporozoítos na forma esporulada, medindo de $7 \times 3 \mu\text{m}$ cada esporozoíto. O estágio de oocisto é a forma resistente do parasito que é excretado junto com as fezes do hospedeiro definitivo, cães e coiotes, na forma não esporulada. Após 24 horas, os oocistos presentes no ambiente tornam-se esporulados (forma infectante) capazes de infectar um novo hospedeiro (DUBEY, 2003).

N. caninum é um protozoário bastante similar ao *T. gondii*. Ambos pertencem ao filo Apicomplexa, um grupo de parasitos que possui na sua região apical organelas importantes para a penetração nas células hospedeiras (Figura 3). Apesar da semelhança, existem diferenças morfológicas entre *N. caninum* e *T. gondii* que são a estrutura e número de roptrias nos taquizoítas. *N. caninum* apresenta roptrias elétrons densas e em número de 6 a 16, em *T. gondii* elas são porosas e apresenta de 4 a 10. Além disso, o número de micronemas em *N. caninum* são mais numerosos que em *T. gondii*, assim como os microporos que foram mais observados em *T. gondii* (LOCATELLI-

DITTRICH, 2002). Outra diferença é a parede do cisto de *N. caninum* que é mais espessa ($\geq 1\mu\text{m}$) que em *T. gondii* ($< 0,5\mu\text{m}$), mas a distinção nem sempre é possível (DUBEY *et al.*, 1998).

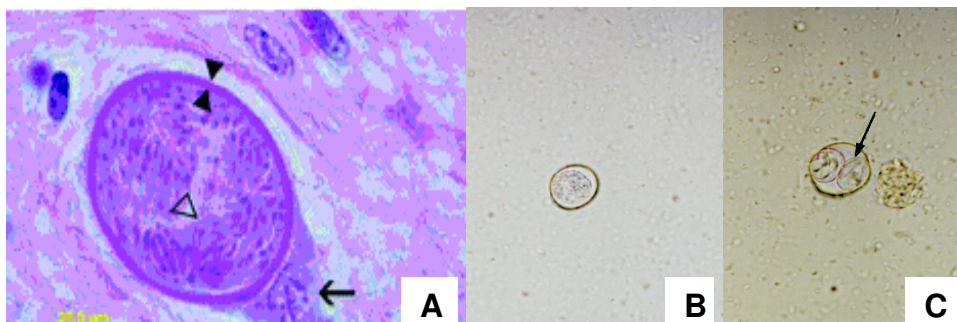
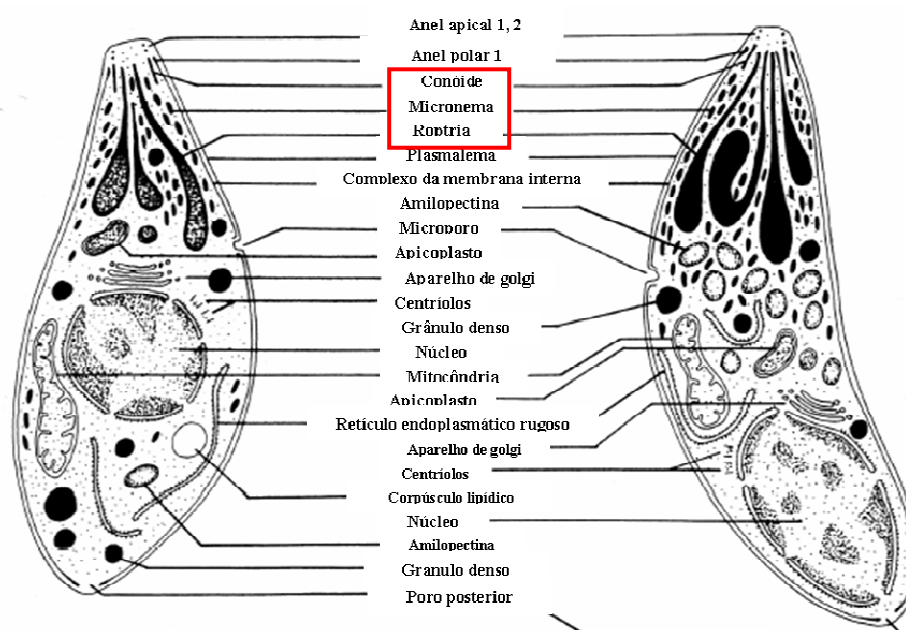


Figura 2: Foto obtida de microscópio óptico mostrando cisto tecidual (A), oocistos não esporulado (B) e esporulado (C) de *Neospora caninum* em uma cultura. (A) cabeça de seta vazada mostrando bradizoítos; cabeça de seta cheia mostrando a espessura da parede do cisto. Fonte: DUBEY *et al.* (2007) LOCATELLI-DITTRICH (2002).



Dubey *et al.* (1998)

Figura 3: Desenho esquemático da ultraestrutura das formas taquizoítas (esquerdo) e bradizoítas (direito) mostrando as organelas do complexo apical (em destaque) de protozoários do filo Apicomplexa. Fonte: DUBEY *et al.* (1998).

2.2. HOSPEDEIROS

Os cães e os coiotes são os hospedeiros definitivos e eliminam os oocistos não esporulados através das fezes. Bovinos, caprinos, ovinos,

caninos, equinos e cervídeos são os hospedeiros intermediários que se infectam através da ingestão de oocistos esporulados (BARR,1998).

Os cães podem ser hospedeiros definitivos na qual apresentam o ciclo intestinal onde há desenvolvimento tanto do estágio sexuado como assexuado do parasito. Eles também podem ser hospedeiros intermediários apresentando o ciclo extra-intestinal, neste caso, apresentando somente o estágio assexuado, com o desenvolvimento de cistos teciduais contendo as formas bradizoítas.

2.3. CICLO DE VIDA DE *Neospora caninum*

No ciclo biológico de *N. caninum* existem três principais estádios infectantes: taquizoítas, cistos teciduais contendo bradizoítas e oocistos esporulados presentes no ambiente descritos anteriormente. Taquizoítas e cistos são os estádios encontrados no hospedeiro intermediário e ocorrem intracelularmente enquanto os oocistos são excretados junto com as fezes do hospedeiro definitivo, na forma não esporulada. Após 24 horas, os oocistos presentes no ambiente tornam-se esporulados (forma infectante) capazes de infectar um novo hospedeiro (DUBEY, 2003). A transmissão horizontal e a transplacentária são as principais formas de disseminação da doença (Figura 4).

Os canídeos são infectados ao ingerirem cisto contendo bradizoítas. No estômago do hospedeiro definitivo as formas esporozoítas penetram nas células intestinais desenvolvendo os merozoítas que se multiplicam por endodiogenia. Essas células se rompem e os merozoítas livres penetram em outras células alvo originando novos merozoítas ou transformam-se em gamontes (microgametócitos e macrogametócitos) no interior das células. Os microgametócitos romperão as células e fertilizarão os macrogametócitos (células femininas) em outras células. A partir da fecundação de micro- e macrogametócitos originará o zigoto ou oocisto não esporulado que será depositado no ambiente junto com as fezes dos cães (McALLISTER, 1999), A forma não esporulada ou não infectante tornará infectante ou esporulada após

24 horas e será ingerida pelos hospedeiros intermediários junto com a água ou alimento contaminado com as fezes do hospedeiro definitivo.

No hospedeiro intermediário, os oocistos esporulados sob a ação de baixo pH e sucos gástricos, liberam os esporozoítas que penetrarão nas células do trato gastrointestinal, posteriormente indo para a circulação sanguínea e linfática. Irão se localizar em vários tecidos como nos órgãos reprodutores da fêmea, na musculatura, sistema nervoso central e periférico e na retina. Nesses tecidos eles se multiplicam na forma de taquizoítas formando, posteriormente, os cistos teciduais. O processo que leva a formação de cisto ainda é desconhecido, mas acredita-se que seja desencadeado pela imunidade. Em alguns casos, os cistos podem se romper e ocorrer a reativação nesses animais cronicamente infectados. Na fase crônica, os cistos contêm as formas bradizoítas (estádio latente) que são infectantes para os hospedeiros definitivos (ANDREOTTI, 2001).

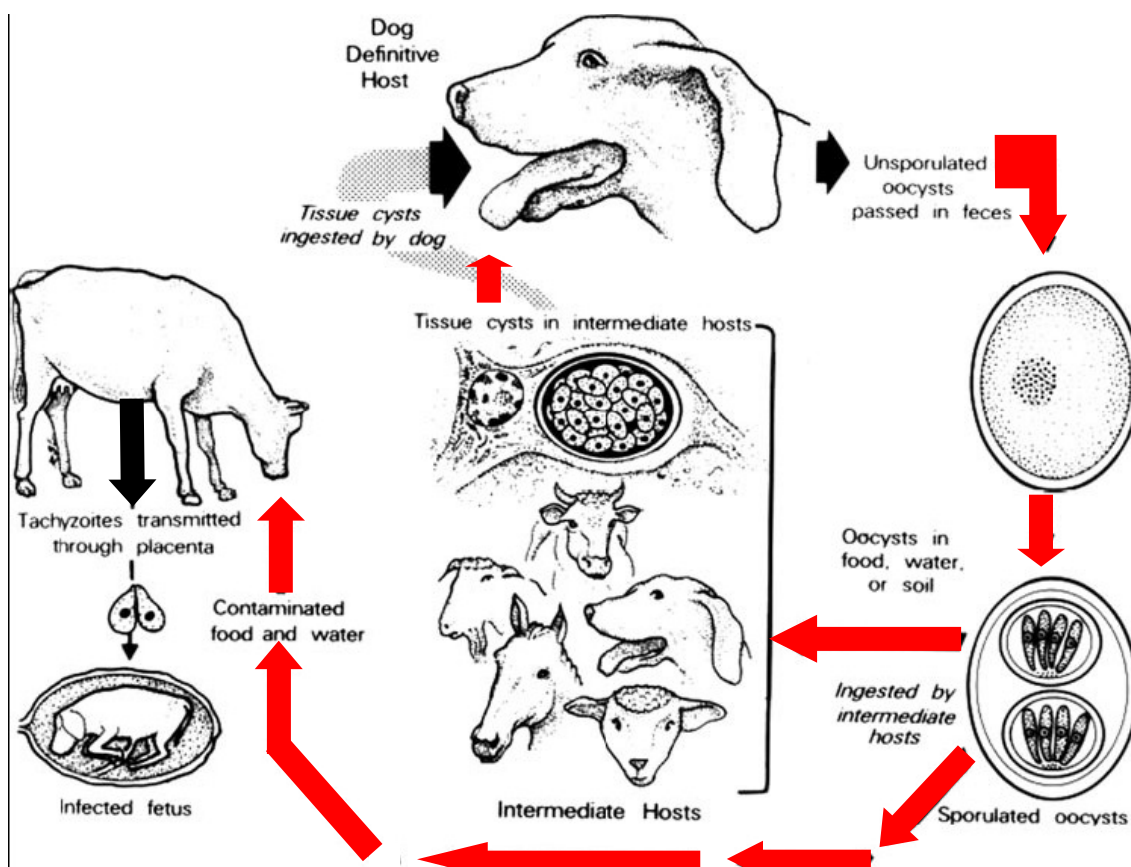


Figura 4: Ciclo de vida do protozoário *Neospora caninum*. Transmissão horizontal representada pelas setas vermelhas. Transmissão vertical representada pelas setas pretas.

Fonte: DUBEY (2003).

2.4. FORMAS DE INFECÇÃO

2.4.1 Transmissão horizontal

A transmissão horizontal ocorre quando os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos esporulados, que são liberados por cães que ingeriram cistos de *N. caninum* dos tecidos do hospedeiro intermediário (McALLISTER, 1999).

As fontes de infecção para os cães precisam ainda ser determinadas. As placentas, os fetos de bovinos e as carcaças de bezerros infectados via congênita podem conter cistos viáveis de *N. caninum*, e conseqüentemente, infectar os cães, se ingeridos (McALLISTER, 1999). O parasito infecta as placentas de bovinos que são consumidas frequentemente por cães nas fazendas (FIORETTI *et al.*, 2000). Após o consumo, foi observado que os cães eliminaram oocistos de *N. caninum* (DIJKSTRA *et al.*, 2001).

A presença dos estádios infectivos de *N. caninum* nas placentas originou um debate sobre a placentofagia, comportamento observado em ruminantes. Experimentos demonstraram que as vacas parturientes ingerem a sua placenta e a de outras vacas, o que poderia ser outra via de transmissão horizontal de neosporose entre os bovinos (MODRY *et al.*, 2001 *apud* LOCATELLI – DITTRICH, 2002)

2.4.2 Transmissão vertical

O *N. caninum* também pode ser transmitido verticalmente, via transplacentária, das vacas para as suas descendências por várias gerações. Porém, a forte associação epidemiológica entre a presença de cães e a ocorrência de neosporose bovina, indica que a transmissão horizontal é necessária para manter a infecção nos rebanhos (McALLISTER, 1999). O *N. caninum* é um patógeno primário e a infecção fetal generalizada pode ocorrer dentro de um mês após a inoculação experimental da mãe (LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

A transmissão transplacentária de *N. caninum* é considerada a principal via de transmissão em bovinos. A eficiência desse tipo de transmissão pode ser de 81% a 95%, confirmada pela presença de anticorpos pré-colostrais nos bezerros nascidos de mães soropositivas. A transmissão do parasito pode ocorrer via congênita por gerações sucessivas, mantendo a infecção nos rebanhos. Há suposições de que os bovinos podem permanecer infectados durante toda a sua vida, mas nem todos os bovinos infectados transmitem o parasito à sua descendência. Os fatores que determinam a transmissão de *N. caninum* da mãe para o feto, são ainda desconhecidos (HEMPHILL *et al.*, 2000).

2.4.3 Infecção lactogênica

A transmissão lactogênica de *N. caninum* já foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos, alimentados com taquizoítas adicionados ao colostro, mas não há evidências que o colostro de bovinos com infecção natural possa infectar bezerros recém-nascidos (DAVISON *et al.*, 2001).

2.5. SINAIS CLÍNICOS DE NEOSPOROSE

2.5.1 Cães

A maioria dos casos de neosporose em cães é diagnosticada em filhotes com infecção congênita (DUBEY e LINDSAY, 1993). Animais de qualquer idade podem ser infectados e os sinais clínicos podem variar amplamente. A doença pode se manifestar de forma localizada ou generalizada em vários órgãos, como sistema nervoso central, músculo esquelético, língua, músculo esofágico, coração, fígado, glândulas adrenais, pele e olhos (PETERS *et al.*, 2000; DUBEY, 2003).

O *N. caninum* foi observado em cérebro de um cão da raça boxer de dois meses de idade que desenvolveu paralisia dos membros pélvicos, atrofia

muscular e miosite no esôfago. Os sinais neurológicos associados a neosporose dependem do órgão e tecidos parasitados, em geral os membros pélvicos são mais severamente afetados do que os membros torácicos (DUBEY, 2003). Outras disfunções mais comuns em animais adultos são as dermatites, cardiomiosites e pneumonias (PLUGGE, 2008). As fêmeas com infecção sub-clínica transmitem o parasito aos fetos e as ninhadas sucessivas podem nascer infectadas (DUBEY *et al.*, 1990 *apud* LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

2.5.2 Bovinos

A neosporose em bovinos pode causar abortos, infertilidade, nascimento de bezerros natimortos ou doentes (DUBEY e LINDSAY, 1996). Bovinos adultos infectados com *N. caninum* não demonstram nenhum sinal clínico da doença. Vacas gestantes, por outro lado, podem abortar e o aborto pode acontecer em infecções recentes, crônica ou congênita. Além disso, vacas infectadas podem abortar em sucessivas gestações. Bezerros infectados com *Neospora caninum* normalmente nascem saudáveis, mas persistentemente infectados (STENLUND, 2000).

Os fetos podem morrer no útero e serem reabsorvidos, mumificados ou autolisados. Alguns bezerros infectados congenitamente nascem doentes ou tornam-se doentes nos primeiros dois meses de vida. O parasito invade o SNC, resultando em sinais neurológicos como deformações dos membros, flexão e hiper extensão dos membros anteriores e/ou posteriores, ataxia, diminuição dos reflexos patelares, perda da consciência próprio receptiva dos membros, paralisia e peso abaixo do normal (STENLUND, 2000; DUBEY e LINDSAY, 1996).

As infecções congênicas e os abortos ocorrem em bovinos leiteiros e de corte, mas com maior número de casos nos rebanhos leiteiros (ANDERSON *et al.*, 2000). As vacas soro-positivas produzem menos leite e são descartadas mais cedo, diminuindo a vida produtiva. Nos bovinos de corte, soro-positivos, há um maior risco de abortamentos e natimortos, além do aumento de descarte por problemas reprodutivos (LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

Existem vacas infectadas que não abortam, e a patogênese do abortamento ainda não é bem compreendida. O resultado da infecção por *N. caninum* depende de alguns fatores, segundo HEMPHILL *et al.* (2000):

1. O momento da parasitemia durante a gestação;
2. A quantidade e duração da parasitemia;
3. A eficiência da resposta imune materna;
4. A capacidade da resposta imune do feto.

Quando a transmissão ocorre no início da gestação, geralmente a consequência é a morte fetal. Durante a gestação as alterações do sistema imune materno tornam a mãe mais vulnerável à neosporose, pela produção de citocinas pelas células trofoblásticas fetais, fazendo com que diminua a produção de interferon gama, o que pode influenciar na recrudescência de uma infecção crônica (HEMPHILL *et al.*, 2000).

2.6. DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE EM BOVINOS

A neosporose tem sido relatada frequentemente em bovinos, gerando forte impacto econômico devido ao grande número de abortamentos decorrentes da doença (TREES *et al.*, 1999). Para os bovinos, a principal fonte de infecção ocorre durante a gestação de fêmeas soropositivas, podendo ocorrer reativação do protozoário dos cistos teciduais e infecção transplacentária por taquizoítas. As consequências da infecção transplacentária são: morte embrionária ou aborto, nascimento de bezerros frágeis com sinais nervosos ou nascimento de bezerros persistentemente infectados (DUBEY *et al.*, 2002).

O diagnóstico é realizado através da análise do histórico do rebanho, sinais clínicos e dados de laboratório. O sinal que sugere infecção por *N. caninum* é a ocorrência de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, os abortamentos e ocorrência de natimortos (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Bovinos que não apresentam sinais clínicos ou podendo ser inespecíficos para neosporose dificultam o correto diagnóstico da doença. Desta forma, os exames laboratoriais são necessários para a confirmação da infecção por *N. caninum* que é realizada através de exames parasitológicos, histopatológico, imuno-histoquímico, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e o isolamento dos parasitos em cultivo celular ou em animais de laboratório. Além disso, podem ser utilizados os exames sorológicos como o imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) que detectam animais infectados, bem como aqueles que entraram em contato com o protozoário.

2.6.1 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos são utilizados em estudos epidemiológicos de abortamentos por *N. caninum*, pois são indicados para verificar a exposição e o risco de infecção por esse parasito em um rebanho.

Existem vários testes que detectam anticorpos específicos para *N. caninum*. Os mais comuns são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA). Para a realização desses testes é necessário anticorpos secundários espécie-específicos conjugado a uma enzima ou fluoróforo para detectar anticorpos anti-*N. caninum* (ATKINSON *et al.*, 2000).

Existem vários antígenos imunorreativos que já foram descritos para *N. caninum*. Os antígenos imunodominantes dos taquizoítas são o p37 e p29/30, localizados nos grânulos densos e no vacúolo parasitóforo, considerados as principais proteínas utilizadas em testes sorológicos (MCALLISTER & LATHAM, 2002).

O valor de *cut-off* entre a reação positiva e negativa para os testes sorológicos ainda não foi completamente definido porque há poucos estudos com infecções experimentais em bovinos (DUBEY *et al.*, 1998).

O título de anticorpos pode variar conforme o animal, vacas naturalmente infectadas podem ter flutuação do título de anticorpos durante a gestação, podendo situar-se abaixo do valor positivo do *cut-off*, em alguns

testes. No diagnóstico de abortamento, os testes sorológicos não devem ser utilizados como testes confirmatórios definitivos, vacas clinicamente normais e sem histórico de abortamento podem apresentar títulos elevados de anticorpos, assim como, a ausência de anticorpos contra *N. caninum* em vacas que abortaram podem ter fetos com resultados positivos por PCR e exames histopatológicos (ANDREOTTI *et al.*, 2003). A sorologia pode ser utilizada como complemento em testes com soros de fetos, bezerros natimortos ou fracos, sendo que a presença de anticorpos contra *Neospora caninum* indicaria infecção congênita, porque não existe transferência de anticorpos maternos nos ruminantes durante a gestação (SAGER *et al.*, 2001). Um resultado negativo para IFI em fetos não descarta a possibilidade de infecção pelo protozoário, considerando-se fatores que podem contribuir para o insucesso como a imaturidade fetal, morte do feto na fase aguda da infecção e a detecção de IgG ao invés de IgM.

Os exames sorológicos são importantes para comprovação do exame clínico e são importantes ferramentas em estudos epidemiológicos, no entanto, é preciso o conhecimento da patogênese e da epidemiologia da doença para a sua correta utilização (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

2.6.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

Esse teste foi o primeiro a ser utilizado no diagnóstico sorológico da neosporose, em 1988. A reação de imunofluorescência indireta é um método utilizado como referência para pesquisa de anticorpos de *N. caninum*, um teste padrão para confirmação com os novos testes. Esses anticorpos se ligarão nos antígenos de superfície celular dos taquizoítas que são fixados íntegros em uma lâmina contendo poços. Um resultado positivo é conferido pela fluorescência de toda a membrana celular de *N. caninum*, nos soros com títulos elevados a moderados. A fluorescência reduzida ou apical ocorre nos soros com títulos baixos e nas reações cruzadas não específicas causadas por infecção com espécies relacionadas, como *T. gondii*, devendo-se interpretar os resultados com cautela (ANDREOTTI *et al.*, 2003).

Sasai *et al.* (1998) identificaram epítomos comuns entre *Eimeria* spp, *T. gondii* e *N. caninum* no conóide, uma estrutura do complexo apical dos parasitos. Vários antígenos de taquizoítas e de bradizoítas de *N. caninum* demonstraram uma reação cruzada com anticorpos direcionados ao *T. gondii* e vice versa (STENLUND *et al.*, 1997). Porém a reação cruzada entre os anticorpos de *N. caninum* e *T. gondii* não foi observada em soros de bovinos (DUBEY *et al.*, 1996).

2.7. ISOLAMENTO *in vitro* E *in vivo* de *Neospora* sp.

No passado, o isolamento e cultivo de *N. caninum* permitiram a identificação do parasito, a produção de taquizoítas para testes sorológicos, o conhecimento do ciclo de vida e biologia do parasita e nas pesquisas de manipulação genética (HEMPHIL *et al.*, 1999; DUBEY e LINDSAY, 1996; LOCATELLI – DITTRICH *et al.*, 2004).

2.7.1 Isolamento *in vitro*

O cérebro e a medula espinhal de fetos e bezerros, de cães, de camundongos e de eqüinos são as principais amostras utilizadas para o inóculo. Nas amostras de fetos, o cultivo *in vitro*, os exames histopatológicos e os imunohistoquímicos são os métodos convencionais utilizados na detecção direta de *N. caninum* (LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

A reprodução de *N. caninum* em cultivo celular ocorre por endodiogenia, similar ao *Isospora* sp., *Hammondia* sp. e *T. gondii*. Contudo, somente *Neospora* e *Toxoplasma* são mantidos continuamente em cultivo celular com passagens seriadas realizadas por inoculações dos taquizoítas em novas células não infectadas (DUBEY *et al.*, 2002).

A linhagem celular VERO (African Green monkey kidney) é a mais utilizada para a propagação do *Neospora caninum in vitro* (DUBEY, 2003). Conforme estudos realizados por Cadore *et al.* (2009), essa linhagem apresentou maior produção de taquizoítas/célula, o que pode ser explicado pelo fato de o *Neospora caninum* estar adaptado ao cultivo de células VERO.

Os efeitos citopatogênicos do desenvolvimento de *N. caninum*, em cultivo celular são o rompimento das células hospedeiras infectadas com a formação de espaços na monocamada de células. Grupos de taquizoítas intracelulares são observados nas células hospedeiras próximas as áreas de rompimento da monocamada (STENLUND *et al.*, 1997). Os protozoários localizam-se no citoplasma da célula hospedeira e, após romperem as células, aparecem em grupos de quatro a oito parasitos, ligados pela porção posterior. No cultivo celular de *N. caninum*, somente os taquizoítas foram observados (DUBEY e LINDSAY, 1996).

As primeiras cepas de *N. caninum* de cães foram isoladas nos Estados Unidos denominadas NC-1 (DUBEY *et al.*, 1988) e NC-2 (HAY *et al.*, 1990). O primeiro isolamento de *N. caninum* de fetos bovinos foi nos Estados Unidos, com as cepas BPA1 e BPA2 (CONRAD *et al.*, 1993 *apud* LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

Existem diferenças no tempo de isolamento, após infecção, entre cepas de *N. caninum* de cães e de bovinos. Os períodos em que foram observados os parasitas em amostras de cérebro de cães foram menores do que aqueles observados em amostras de bovinos (LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

A proliferação de *N. caninum* parece variar entre as diferentes cepas, pois, alguns isolados multiplicam mais rapidamente que outros. A multiplicação das cepas isoladas de cães é mais rápida do que as de bovinos (STENLUND *et al.*, 1997).

Cheadle *et al.* (1999) isolaram *Neospora* sp. de um equino adulto, identificando-o como *N. hughesi* devido as similaridades ultraestruturais e das proteínas imunodominantes entre as cepas. Dubey *et al.* (2001), isolaram *N. hughesi* da medula espinhal de eqüino adulto, caracterizando a espécie por PCR.

2.7.2 Isolamento *in vivo*

Yamane *et al.* (1998) observaram que a inoculação de extrato de cérebro de feto suspeito de infecção por *N. caninum* em camundongos imunodeprimidos e subsequente inoculação do mesmo extrato em cultivo

celular, aumentaram as chances de obtenção do parasita. Cepas de *N. caninum* de cães foram isoladas pela inoculação em cultivo celular e em vários tipos de camundongos imunodeprimidos (LOCATELLI – DITTRICH, 2002).

No isolamento de *N. caninum* em camundongos, os melhores são do tipo BALB/c e KO (nocauteados para interferon-gama). Os camundongos KO, inoculados via subcutânea e intraperitoneal com cérebro de cão, morreram com neosporose sistêmica, e os taquizoítas foram observados no exsudato peritonial (DUBEY *et al.*, 1998).

Os gerbils imunocompetentes podem ser utilizados para o isolamento de *N. caninum*, a partir de amostras infectadas (GONDIM *et al.*, 2001). Os gerbils podem ser utilizados na manutenção de taquizoítas (GONDIM *et al.*, 1999) e, principalmente, no isolamento de *Neospora caninum*, em que ele é tido como modelo animal devido ao grande número de cistos encontrados no cérebro desses animais (GONDIM *et al.*, 2001) e por serem susceptíveis a desenvolver neosporose aguda (LINDSAY, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Confeccionar lâminas de imunofluorescência indireta (IFI) como auxiliar no diagnóstico de neosporose bovina com o objetivo de comercialização.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar um cultivo de *N. caninum* *in vitro* e manutenção *in vivo*.

Cultivar os parasitos visando à produção de grande quantidade de formas taquizoítas para confecção de lâminas para diagnóstico.

3.2.2. Produzir estoques de formas taquizoítas íntegros congeladas em soro albumina bovina.

Estocar para disponibilizar na confecção das lâminas de IFI.

3.2.3. Testar as lâminas confeccionadas para a técnica de imunofluorescência.

Confeccionar e padronizar as lâminas para IFI que serão disponibilizadas para a comercialização.

4. METODOLOGIA

4.1 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

4.1.1 Cultura *in vitro* e manutenção *in vivo* de *N. caninum*

- Meio de cultura D-MEM (Sigma): 10 % de caldo de triptose fosfato (TPB), 10 % soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 1mM piruvato de sódio e 10 µL de flotril para cada 500 mL de meio.
- Meio de cultura F10/199 (SIGMA): 10% de soro fetal bovino (SFB), 1 mL de estreptomicina (100 µg/mL), 1 mL de penicilina (100 µg/mL) e 1 mL de fungizon (1,25 µg/mL) para cada 500 mL de meio.
- Meio de cultura Eagle (Sigma): 10 % de caldo de triptose fosfato (TPB), 10 % de soro fetal bovino (SFB), 1 mL de estreptomicina (100 µg/mL), 1 mL de penicilina (100 µg/mL) e 1 mL de fungizon (1,25 µg/mL) para cada 500 mL de meio.
- Tripsina Versene: solução versene 10 %, solução tripsina 3 % e tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 7,4.

4.1.2. Congelamento de *N. caninum* em dimetilsulfóxido (DMSO)

- Solução de congelamento: 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) diluído em soro fetal bovino (SFB).

4.1.3. Congelamento de *N. caninum* com soro albumina bovina (BSA)

- BSA (Sigma): a 1 % diluído em tampão fosfato salino (PBS).

4.1.4. Técnica de imunofluorescência indireta

- PBS: NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,15 g; KH₂PO₄ 0,2 g; para 1L H₂O destilada. pH: 7,2.
- Anticorpo secundário anti-IgG bovino conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC - SIGMA): diluição 1:100 em tampão fosfato salino (PBS).
- Glicerina tamponada: a 90 % diluída em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2.

4.2 CULTIVO DE *N. caninum in vitro* E MANUTENÇÃO *in vivo*

4.2.1 Cultivo de *N. caninum* em células VERO

Uma ampola contendo células VERO foi retirada do nitrogênio líquido e descongelada rapidamente em banho-Maria a 37 °C. Logo em seguida, o meio de congelamento com as células foi colocado em tubo de centrifuga e adicionados a ele 5 mL de meio de cultivo Eagle. A suspensão foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 5 mL de meio Eagle que foi colocado em uma garrafa T75 com mais 20 mL de meio de cultivo. A garrafa foi colocada em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Após 48 horas a monocamada de células estava fechada, aderidas ao fundo da garrafa devido à multiplicação das células, e foi ampliada para mais três garrafas T75. Para isso, a monocamada foi lavada com PBS estéril, colocado 5 mL de tripsina estéril e incubada por 10 minutos a 37 °C, para desprender as células da parede da garrafa. Para neutralizar a ação da tripsina foram colocados mais 5 mL de meio Eagle e distribuídos em três garrafas T75. Cada garrafa foi completada com 20 mL de meio de cultivo Eagle, SFB e TPB, incubadas a 37 °C.

Após 24 horas, quando a monocamada estava aproximadamente 80% confluenta, as células foram infectadas com *N. caninum*. Para isso, foram utilizados 5 mL de suspensão de uma garrafa T75 apresentando taquizoítas livres, com 80% da monocamada destruída (cepa NC-1, cedida pela doutora Hilda Pena, da USP). Os taquizoítas retirados foram colocados numa garrafa T75 contendo células VERO com meio de cultivo Eagle sem antibiótico e sem SFB.

Em garrafas com a monocamada totalmente destruída, após a retirada do meio, foram adicionados 5 mL de tripsina e incubadas por 5 minutos a 37 °C, para que os taquizoítas se desprendessem da parede da garrafa. A tripsina com os taquizoítas foi coletada e centrifugada juntamente com o meio retirado anteriormente, para a retirada dos taquizoítas. O *pellet* formado foi ressuspenso com meio de cultivo e passado 3 vezes em agulha tamanho 22G1 (para que as células com neosporas fossem rompidas e liberassem o

protozoário) e distribuído para três garrafas com células VERO, com a monocamada fechada, de mesmo tamanho da que foi retirada os neosporas. Para cada garrafa T75 com a monocamada destruída são infectadas 3 T75 novas.

Além disso, para a transferência dos protozoários pode-se apenas coletar o sobrenadante da garrafa infectada (quando o tapete celular ainda não estiver 80% destruído), lavar com 5 mL de PBS e centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com 5 mL de meio Eagle. Infectar uma nova garrafa, mantendo a garrafa velha já infectada anteriormente, preenchendo-a com meio Eagle, mantendo-a até que a monocamada de células esteja totalmente destruída.

4.2.2 Manutenção de *N. caninum* em gerbil (*Meriones unguiculatus*)

Foi retirado o meio de uma garrafa infectada contendo taquizoítas livres de tamanhos menores (são de formato ovóide e apresentam movimentos mais rápidos em relação aos taquizoítas maiores), esse meio foi centrifugado em 2500 rpm por 10 minutos e o *pellet* ressuspensado em 2 mL de meio Eagle sem antibiótico e inoculados via peritoneal em um gerbil. Em garrafas com a monocamada destruída, após a retirada do meio, são adicionados 5 mL de tripsina e incubada por 5 minutos a 37° C, para que os taquizoítas desprendam da parede da garrafa. A tripsina então foi retirada e centrifugada juntamente com o meio retirado anteriormente.

O gerbil foi colocado dentro de um recipiente com tampa contendo gaze umedecida com éter, após 5 minutos, quando o animal estivesse morto, ele era retirado e preso numa prancha de dissecação com o abdômen voltado para cima. Com a ajuda de uma pinça e uma tesoura a pele do abdômen da parte mais inferior foi puxada e cortada em direção ao tórax, com cuidado para que o peritônio continue íntegro. Com a ajuda de uma seringa com agulha foram colocados 10 mL de PBS dentro da cavidade peritoneal, dessa forma, foram feitos vários movimentos leves com os dedos no abdômen. O líquido foi retirado com a agulha e centrifugado em 2500 rpm por 10 minutos, o

sobrenadante descartado e uma pequena parte do *pellet* foi colocado em uma lâmina para a visualização de taquizoítas. Após identificar a presença de neosporas o *pellet* restante foi ressuspenso em meio de cultivo sem antibiótico e passado na agulha de 22G1, para então, ser utilizado na infecção de uma garrafa com células VERO.

4.3. CONGELAMENTO DE TAQUIZOÍTAS EM DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Para o uso no cultivo celular, foram congelados taquizoítas (NC-1) em nitrogênio líquido. Das garrafas T75 infectadas em que apresentavam o tapete celular aproximadamente 80% destruído, foi retirado o sobrenadante e transferido para tubos de centrifuga. As garrafas foram lavadas com 5 mL de PBS, que foram combinados com o sobrenadante. Foram colocados 5 mL de tripsina em cada garrafa T75 as quais foram incubadas por cinco minutos, para desprender os taquizoítas restantes. Tudo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso com solução de congelamento de DMSO e distribuído para dois criotubos para cada garrafa T75 (1,5 mL para cada criotubo).

Os criotubos foram identificados e envoltos por algodão e papel alumínio e colocados dentro de uma caixa de isopor, no freezer a -80 °C. Após 24 horas, os criotubos eram retirados do algodão e do papel alumínio e armazenados no botijão de nitrogênio líquido.

4.4. CONGELAMENTO DE TAQUIZOÍTAS EM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Para a produção das lâminas, foram utilizados taquizoítas armazenados em BSA. A armazenagem foi realizada após a destruição da monocamada de células VERO. O meio foi retirado e colocados 5 mL de tripsina na garrafa, a qual foi incubada por 5 minutos a 37 °C. O conteúdo retirado foi misturado com o meio anterior e centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o *pellet* ressuspensado com 10 mL de BSA a 1% e então congelado a - 80 °C.

4.5. CONFECÇÃO DE LÂMINAS DE IFI

Os frascos contendo BSA e taquizoítas foram descongelados em banho-Maria a 37 °C. A suspensão foi centrifugada em 1000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado com 15 mL de PBS. Em seguida, os 15 mL foram filtrados com membrana com poros de 5 micra, para a retirada das células VERO. Foi realizada mais uma centrifugação em 1000 rpm por 10 minutos e o *pellet* ressuspensado com 1 mL de PBS. A suspensão foi retirada do tubo e passada cinco vezes em agulha de tamanho 22G1. Uma parte dessa suspensão de taquizoítas foi colocada na câmara de Neubauer para quantificação. A contagem foi feita em quatro quadrantes e multiplicada por 50. O resultado foi em número de taquizoítas/ μ L. Conforme o protocolo para confecção de lâminas de IFI (cedido pela Doutora Rosângela da UFPR), para cada 1 mL de suspensão contendo taquizoítas serão necessários 1×10^6 taquizoítas, desta forma, foi feita a diluição para chegar a esse número por mL de suspensão.

Após a diluição, a suspensão contendo 1×10^6 taquizoítas/mL foi distribuída em lâminas com 10 poços cada, em cada poço foi colocado 25 μ L. As lâminas preenchidas foram colocadas em estufa a 37 °C para a fixação dos taquizoítas. Após 48 horas as lâminas foram retiradas da estufa e colocadas em caixas com papel alumínio no freezer a -80 °C.

4.6. TESTE DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

As lâminas com taquizoítas armazenadas a - 80 °C foram colocadas na estufa a 37 °C para a devida secagem. No teste foram utilizados soros controle positivo e negativo e as amostras de soro. Os soros foram diluídos na proporção de 1:50 (10 μ L de soro e 490 μ L de PBS). As lâminas preenchidas

com 25 µL dos soros em cada poço foram colocadas em um recipiente plástico com gaze úmida, tampado e incubado na estufa a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em cubas de vidro contendo PBS por 5 minutos, sob agitação, seguida de lavagem com água destilada.

As lâminas foram secas e receberam 25 µL do anticorpo anti-IgG bovino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína em uma diluição de 1:100 (10 µL de conjugado para 990 µL de PBS). As lâminas foram incubadas nas mesmas condições acima e lavadas em PBS por 10 minutos sob agitação. O PBS foi desprezado e a cuba completada com água destilada e colocada sob agitação por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram secas com auxílio de um aquecedor, montadas com uma gota de glicerina em cada poço e coberta com lamínula de vidro. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência no aumento de 400 vezes.

Os poços em que foram encontrados taquizoítas com fluorescência em volta de toda a membrana celular foram considerados positivos, sendo o soro pertencente a um animal soropositivo para *Neospora caninum*. Já os poços em que os taquizoítas não apresentaram membrana fluorescente ou fluorescência apical (fluorescência apenas na região apical do taquizoíta), foram considerados negativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A célula VERO foi escolhida para o cultivo de *Neospora caninum* por ser a mais utilizada para a propagação *in vitro*. Esse tipo de célula apresentou melhor desenvolvimento dos taquizoítas em número e tamanho (DUBEY, 2003; CADORE *et al.*, 2009). Porém, neste trabalho o cultivo de células VERO apresentou vários problemas em relação à formação de vacúolos intracelulares e diminuição da confluência do tapete celular, o que dificulta o cultivo de protozoários intracelulares que necessitam de células íntegras para sua efetiva infecção. Dessa forma, foram realizados testes com diferentes meios de cultivo para verificar a integridade da monocamada celular. Os meios testados foram:

D-Mem com SFB, glutamina, piruvato e antibiótico; meio F10/199 com SFB e antibióticos. As células se adaptaram bem ao meio D-Mem, com ausência de vacúolos intracelulares e aumento da confluência da monocamada de células. Porém, alguns espaços entre as células continuaram devido ao elevado número de passagens realizadas nessas células VERO. As células mais antigas (maior número de passagens) costumavam apresentar esses problemas. Posteriormente, o TECPAR ganhou uma nova cepa de células VERO (doada pelo laboratório Marcos Enrietti) adaptadas ao meio Eagle com 10% de TPB e 10% de SFB. Essas células VERO adaptadas em meio Eagle apresentaram bom desenvolvimento sem ocorrência de vacúolos e aberturas entre a monocamada, eram células novas com poucas passagens (Figura 5).

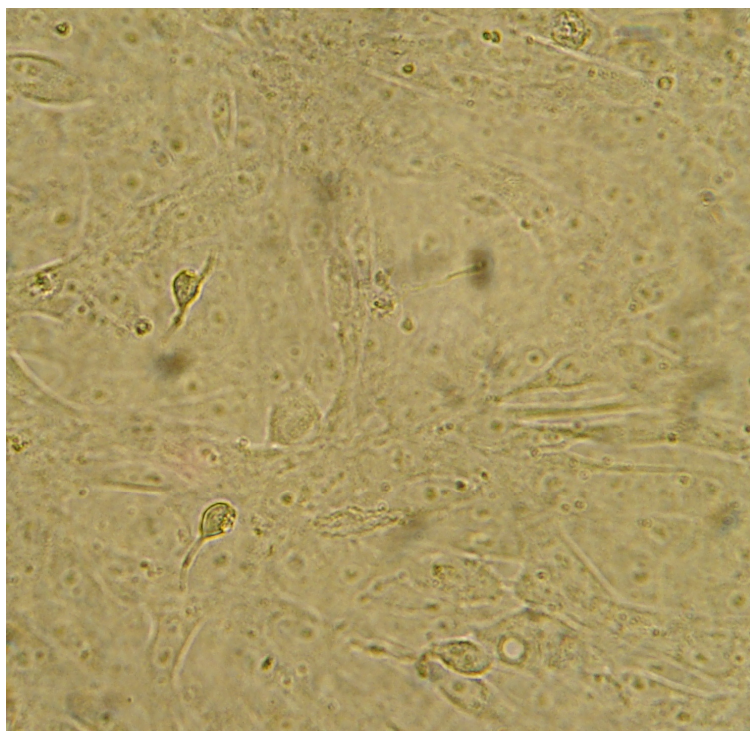


Figura 5: Células VERO não infectadas, com ausência de vacúolos e espaços intracelulares, com 24 horas (aumento de 400X).

O acompanhamento do desenvolvimento dos neosporas foi realizado através de microscópio invertido (Olympus) em aumento de 400 vezes. A presença de efeitos citopáticos caracteriza a efetiva infecção pelo protozoário, com destruição total da monocamada de células em poucos dias (Figura 6). O crescimento contínuo do protozoário foi assegurado pela substituição do meio duas vezes por semana e pela transferência dos parasitos para garrafas novas

com células VERO, realizada quando aproximadamente 80% do tapete celular encontrava-se destruído. Foi necessário observar cada garrafa para seguir um protocolo mais adequado, cada garrafa apresentou diferentes quantidades e tamanho de taquizoítas. Dessa maneira, dependendo da quantidade e tamanho dos protozoários, eram feitas de uma a três garrafas novas para cada garrafa já infectada. Além disso, era necessário observar se era preciso inocular os protozoários em gerbils para a expansão da população de *N. caninum*.

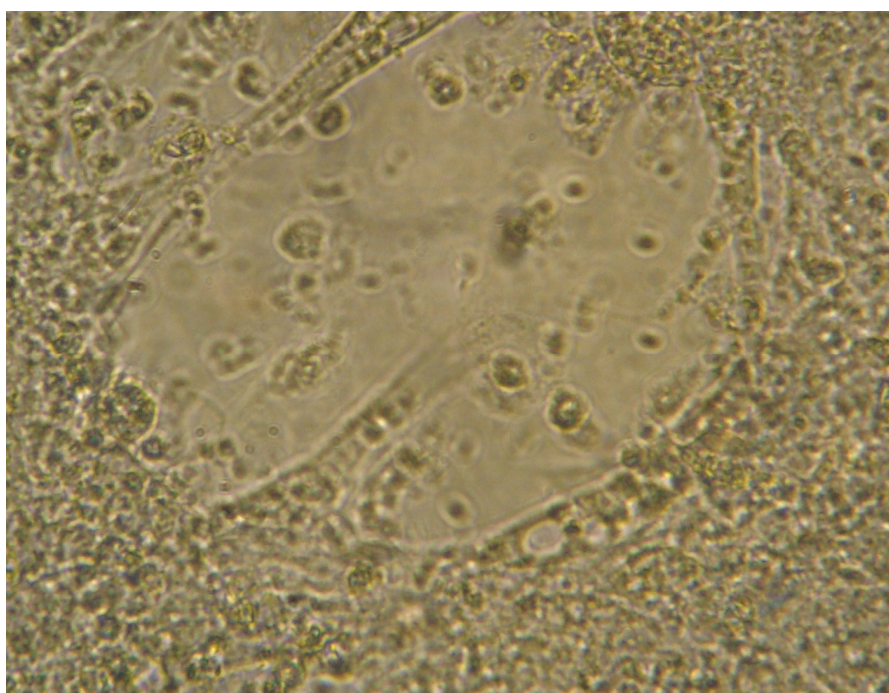


Figura 6: Efeito citopático da cultura de células VERO infectadas (Aumento de 400X)

O cultivo também apresentou vários problemas em relação a quantidade exagerada de *debris* celulares e a diminuição do tamanho dos taquizoítas (Figura 7 e 8). Taquizoítas pequenos eram obtidos quando eram coletados depois de passado algum tempo da total destruição da camada de células. O cultivo foi melhor aproveitado quando os taquizoítas apresentavam maior poder infectante, momento em que esses destruíam a monocamada de células rapidamente (deixando poucos *debris* celulares) e apresentavam maior tamanho em relação aos anteriores (Figura 9).

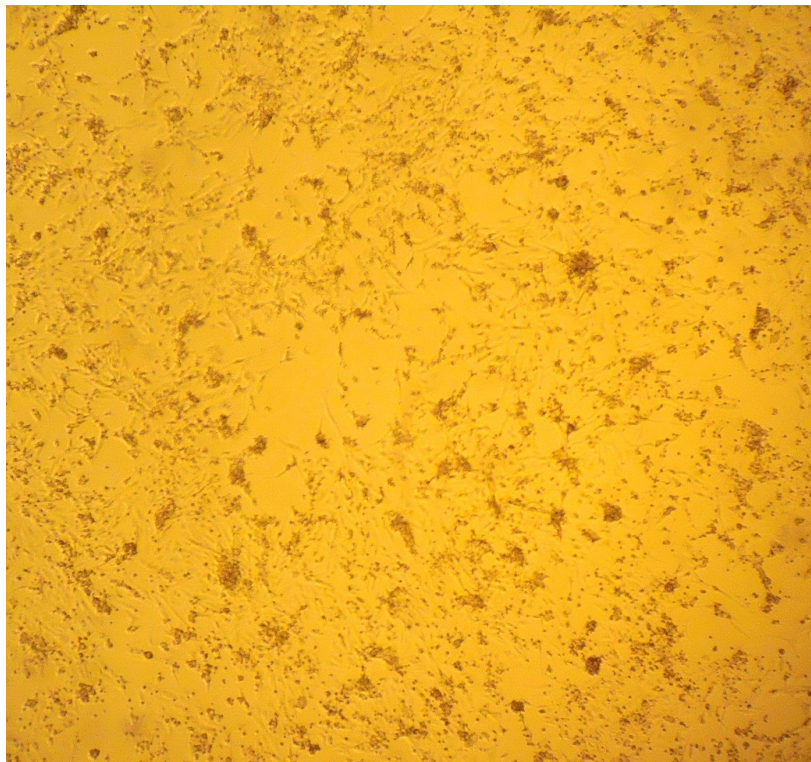


Figura 7: Foto de cultivo de célula VERO infectada apresentando grande quantidade de *debris* celulares (aumento de 100x).

Os taquizoítos de *N. caninum* cultivados *in vitro* perderam seu potencial infectante, diminuindo de tamanho facilmente. A falta de nutrientes e de espaço são alguns dos fatores que parecem interferir no bom desenvolvimento do protozoário. Dessa forma, os neosporas foram inoculados em gerbils para conferir protozoários maiores, o que facilita a sua visualização nas lâminas de IFI. Os gerbils podem ser utilizados na manutenção de taquizoítas (GONDIM *et al.*, 1999) e, principalmente, no isolamento do parasito na qual é considerado como modelo animal devido ao grande número de cistos produzidos no cérebro desses animais (GONDIM *et al.*, 2001 *apud* LOCATELLI – DITTRICH, 2002) e por serem susceptíveis a desenvolver neosporose aguda (LINDSAY, 2005).

Após a retirada dos taquizoítas *in vivo* foi observado que esses apresentaram aumento em tamanho, sendo capaz de destruir a monocamada de células em pouco tempo (maior infectividade) em relação aos taquizoítas que permaneciam semanas no cultivo celular (Figura 9 e 10).

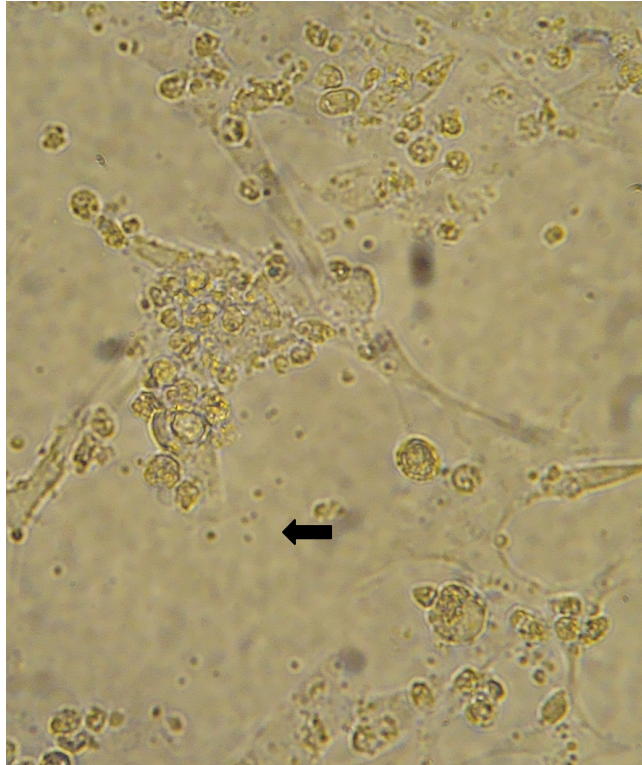


Figura 8: Foto mostrando cultivo de célula VERO com a geração de tachizoítas pequenos (seta) (Aumento 400X).

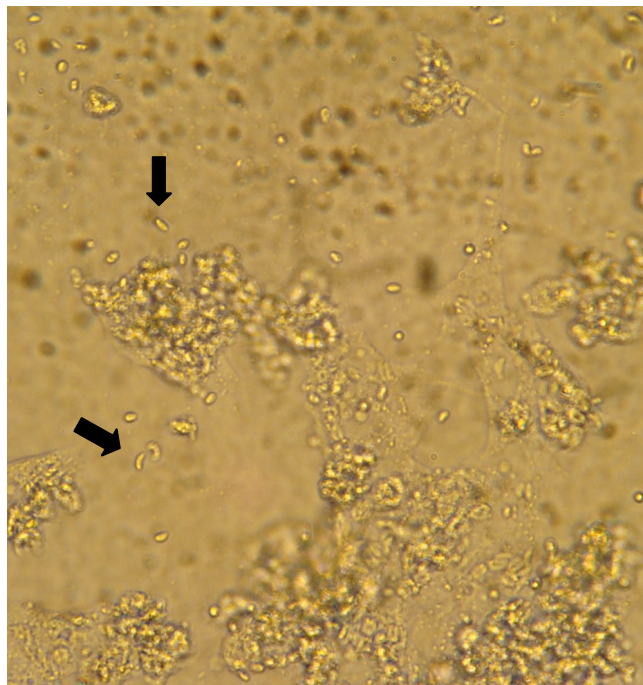


Figura 9: Foto de cultivo de célula VERO mostrando os tachizoítas maiores aos anteriores, cinco dias após a retirada da cavidade peritoneal de gerbil (aumento de 400X)

É necessário o monitoramento diário do gerbil infectado para que ele seja eutanasiado no momento em que o protozoário estiver na sua forma mais ativa e infectante (aproximadamente uma semana). Quando o animal estava bastante debilitado, magro, fraco e com os pêlos arrepiados ele foi eutanasiado para a retirada dos parasitos da cavidade peritoneal. Em seguida, o material foi ressuspensão em PBS, centrifugado e o sedimento foi analisado no microscópio óptico em aumento de 400x para verificar a presença e quantidade de taquizoítas de *N. caninum*, para posterior passagem para uma garrafa nova contendo células VERO.

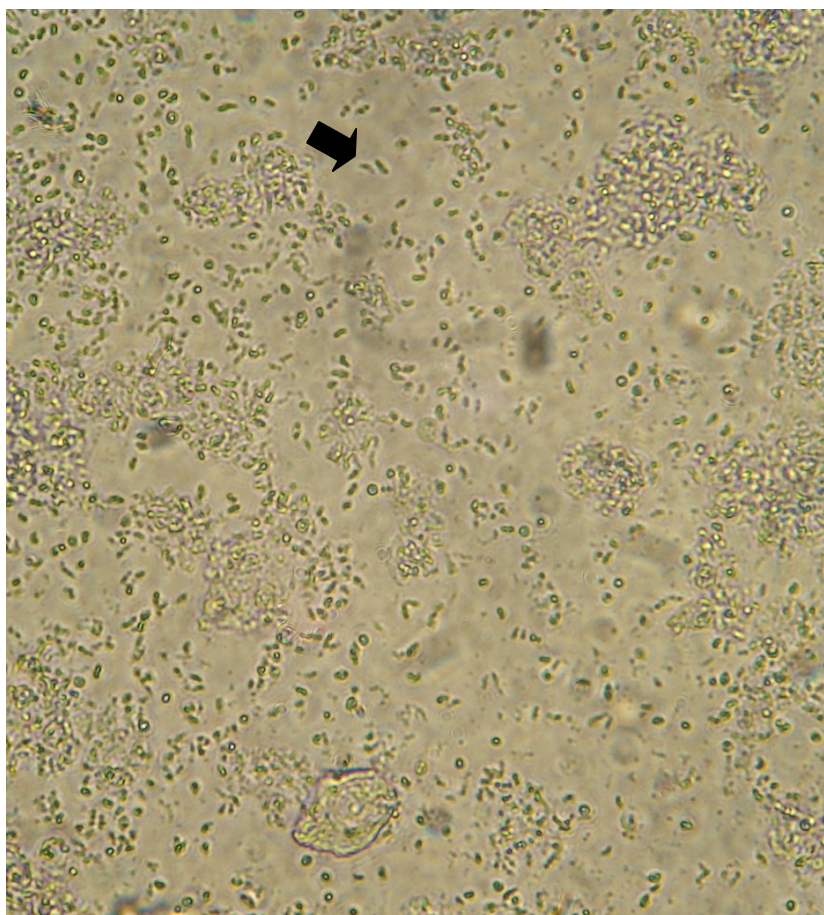


Figura 10: Foto de cultivo de célula VERO mostrando os taquizoítas maiores (seta) com aproximadamente 80% do tapete celular destruído (aumento de 400x).

Após aproximadamente uma semana, o frasco contendo taquizoítas e BSA foi descongelado e colocado uma parte em uma lâmina para verificar se os taquizoítas continuavam íntegros. Com o aumento de 400x foi possível verificar grande número de taquizoítas ainda vivos, apresentando movimento.

A viabilidade do congelamento em BSA 1% não foi totalmente aprovada, os resultados obtidos após o descongelamento do BSA com taquizoítas não foram satisfatórios após verificar as condições das lâminas confeccionadas. O congelamento em BSA 1 % para confecção de lâminas foi testado logo nos primeiros congelamentos.

No processo de padronização da técnica de imunofluorescência as lâminas confeccionadas foram testadas com soros bovinos conhecidamente positivos e negativos. Os taquizoítas apresentaram toda a membrana fluorescente com soros positivos e ausência de fluorescência em soros negativos, porém, tanto os parasitos positivos como os negativos foram difíceis de identificar por causa da presença de grande quantidade de *debris* celulares que fluoesciam junto com os taquizoítas provocando um *background* que atrapalhava a leitura.

Os testes seguintes das lâminas confeccionadas, provenientes de outros frascos com taquizoítas congelados em BSA, também resultaram em lâminas com *debris* celulares. Além disso, apresentou fluorescência fraca em soros conhecidamente positivos.

Devido aos problemas apresentados no congelamento com BSA outras lâminas foram confeccionadas com taquizoítas retirados diretamente do cultivo celular. As lâminas foram testadas e apresentaram menor quantidade de *debris* celulares e fluorescência mais intensa em soros conhecidamente positivos (Figura 11). Porém, é inviável retirar os taquizoítas diretamente das garrafas para a confecção de lâminas para comercialização, devido à grande quantidade necessária para montar o *kit* de diagnóstico.

Os poços em que foram encontrados taquizoítas com fluorescência em volta de toda a membrana celular foram considerados positivos, sendo o soro pertencente a um animal soropositivo para *Neospora caninum*, enquanto que os poços em que os taquizoítas não apresentaram membrana fluorescente ou apenas fluorescência apical foram considerados negativos (Figura 12).

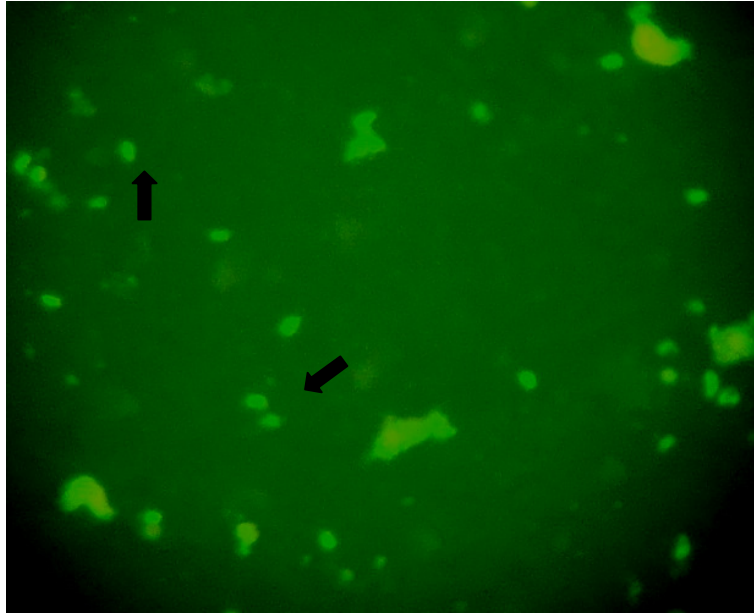


Figura 11: Foto mostrando o resultado da técnica de imunofluorescência indireta em lâmina confeccionada diretamente de cultivo celular. Resultado positivo para a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum*. Setas mostrando taquizoítos fluorescentes (aumento de 400x).

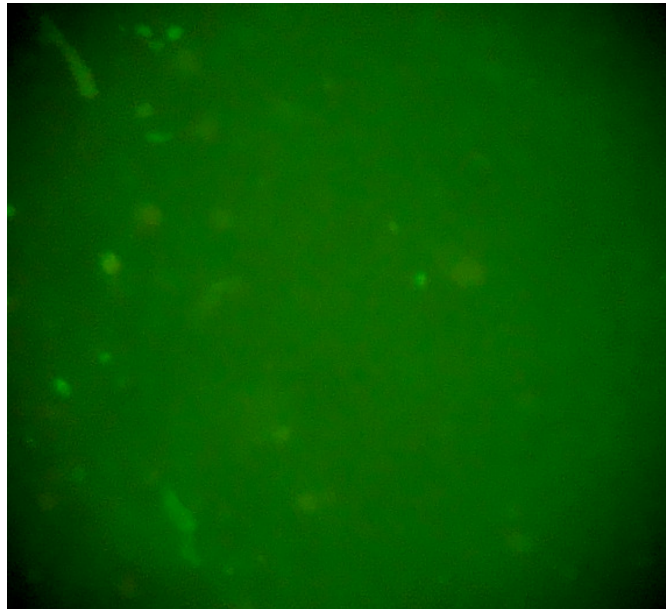


Figura 12: Foto mostrando a técnica de imunofluorescência indireta em lâmina confeccionada diretamente de cultivo celular. Resultado negativo para presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* (aumento de 400x).

6. CONCLUSÃO

Os objetivos desse trabalho foram a obtenção de *N. caninum in vivo* e cultivo *in vitro* para a confecção, e futura comercialização de *kits* de imunofluorescência indireta (IFI) como auxiliar no diagnóstico de neosporose bovina.

Para a comercialização das lâminas existe a necessidade de padronização das etapas, visando procedimentos que possam ser facilmente reproduzidos. Também é necessária a obtenção de lâminas de boa qualidade para que seja possível a fácil visualização, após a realização dos testes de imunofluorescência dos taquizoítas, sem a presença de fatores que possam interferir na leitura. O congelamento em BSA, realizado nesse projeto, visava o estoque de taquizoítas viáveis para futuras confecções de lâminas sem a necessidade de cultivar os parasitos anteriormente, processo que demora e que apresenta dificuldades por não existir um padrão no crescimento e manutenção do parasito. Porém, o congelamento em BSA não permitiu a confecção ideal de lâminas. Portanto, está sendo realizada diretamente do cultivo.

Futuramente novos testes serão realizados com o congelamento de taquizoítas em BSA e glicerol (crioprotetor de fácil utilização). O cultivo em células VERO e a manutenção *in vivo* serão mantidos e os testes serão realizados visando verificar a quantidade e tamanho dos taquizoítas antes e após o congelamento em BSA e glicerol, evitando o congelamento de taquizoítas com grande quantidade de *debris* celulares. Além disso, serão testadas lâminas confeccionadas com taquizoítas obtidos diretamente de gerbils infectados, momento em que foram verificados parasitos de bom tamanho apresentando pouca quantidade de células no sobrenadante.

Os objetivos do trabalho foram realizados com o estabelecimento do cultivo *in vitro* e a manutenção *in vivo*, porém, ainda necessitam de novos testes de padronização para que as lâminas possam ser comercializadas em *kits* de diagnóstico.

7. REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino. **Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, 2001.

ANDREOTTI R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; PAIVA, F. Diagnóstico e controle de neosporose em bovinos. **Embrapa gado de corte**, v.1, n 136, p.1-51, 2003.

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

ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, v. 16, n.3, p.110-113. 2000.

BARR, B.C. Question: What is neosporosis? **Veterinary Exchange**, v.20, n.11(D), p.4, 1998. (Supplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 1998).

CADORE, G.C.; VOGEL, F.S.F; FLORES, E.F.; SANGIONI, L.A.; CAMILLO, G. Susceptibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao *Neospora caninum*. **Ciência Rural**, v. 39, n.5, p.1581-1585. 2009.

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.;ROLSMA, M.D.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. In horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.1537-1543.1999.

DAVISON, H.C.; GUY, C.S.; McGARRY, J.W.; GUY, D.J.; WILLIAMS, D.J.L.; KELLY, D.F.; TREES, A.J.Experimental studies on the transmission of

Neospora caninum between cattle. **Research in Veterinary Science**. V.70, p.163–168. 2001.

DJIKISTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal of Parasitology**, v.31, v.8, p.747-752. 2001.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, Maio, 1988.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; Neosporosis. **Parasitology Today**, Oxford, v. 9, n.12, p. 452-458.1993.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.67, p. 1-59.1996.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; ADAMS, D.S.; McALLISTER, M.M.; ANDERSON-SPRECHER, R.; BASZLER, T.V.; KWOK, O.C.H.; LALLY, N.C.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. **The Journal of Parasitology**. V.83, n.6, p. 1063-1069. 1997.

DUBEY, J.P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M. C.; LIDDEL, S.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1293-1304. 1998.

DUBEY, J. P.; Neosporosis – the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p. 1485-1488. 1999.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 929-946, Jul, 2002.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n.1, p. 1-16. 2003.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **American Society for Microbiology**, p. 323-367, 2007.

FIORETTI, D.P.; ROSIGNOLI, L.; RICCI, G.; MORETI, A.; PASQUALI, P.; POLIDORI, G.A. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitology study and serological follow up. **Journal of Veterinary Medicine**, v.47, p. 47-53. 2000.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; MONTEIRO, Jr, L.A; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in a aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v.47, p.35.1999.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.AO.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v.101, n. 1, p. 1-7. 2001.

HAY, W.H.; SHELL, L.G.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, p.87–89. 1990.

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

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F.J.; DE MEERSCHMAN, F.; ELLIS, J.T.; INNES, E.A.; McALLISTER, M.M.; ORTEGA-MORA, L.M.; TENTER, A.J.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D.J.L.; WOUDA, W. A European perspective on *Neospora caninum* . **International Journal for Parasitology**, v.30, p. 877-924. 2000.

LEEPIN, A.; STUDLI, A.; BRUN, R.; STEPHENS, C.E.; BOYKIN, D.W.; HEMPHILL, A. Host cells participate in the *in vitro* effects of novel diamidine analogues against tachyzoites of the intracellular apicomplexan parasites *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **American Society for Microbiology**, p. 1999-2008. 2008.

LINDSAY, D.S.. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends Parasitology**. v. 21, p.439–440. 2005.

LOCATELLI-DITTRICH, R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no estado do Paraná, Brasil. Tese doutorado. 2002

LOCATELLI-DITTRICH, R. et al. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

MATTOS, B.C.; PATRÍCIO, L.L.F.; PLUGGE, N.F.R.; LANGE, R.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 267-272. 2008.

McALLISTER, M. M.; Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitology Today**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 216-217.1999.

McALLISTER, D.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n.1, p. 4-5.2002.

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

PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitology Research**, v.86, n.1, p.1-7. 2000.

PETERS, M. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, n. v. 31, p. 1144-1148, 2001.

PLUGGE, N.F. Diagnóstico sorológico de neosporose em populações de cães sadios e com sinais neurológicos da microrregião de Curitiba. Tese mestrado. 2008.

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

SASAI, K.; HEMPHILL, A.; MATSUDA, H.; HANIOKA, Y.; FUKATA, T.; BABA, E.; ARAKAWA, A. A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora* and *Toxoplasma*. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 3, 1998.

STENLUND, S.; BJORKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J. M.; KINDAHL, H.; UGGLA, A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, Berlin, v.83, p. 214-219, 1997.

STENLUND, S. *Neospora caninum* in cattle in Sweden, isolation of the parasite and studies of its transmission. Tese de doutorado, 2000.

TREES, A. J.; DAVISON, H. C.; INNES, E. A.; WASTLING, J. M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1195-200, 1999.

YAMANE, I.; SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; HAMAOKA, M.; HARITANI, M.; CONRAD, P.A.; PARK, C.H; SAWADA, M.; UMEMURA, T. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 364–368. 1998.