

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***Neospora caninum*: IMUNOGLOBULINAS COMO
MARCADORES DE INFECÇÃO TRANSPLACENTÁRIA
E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CULTIVOS
CELULARES.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gustavo Cauduro Cadore

Santa Maria, RS, Brasil

2009

***Neospora caninum*: IMUNOGLOBULINAS COMO MARCADORES DE
INFECÇÃO TRANSPLACENTÁRIA E AVALIAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE DE CULTIVOS CELULARES.**

por

Gustavo Cauduro Cadore

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

***Neospora caninum*: IMUNOGLOBULINAS COMO MARCADORES DE
INFECÇÃO TRANSPLACENTÁRIA E AVALIAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE DE CULTIVOS CELULARES.**

elaborada por
Gustavo Cauduro Cadore

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)

Sílvia Gonzalez, Dr. (UFSM)

Sônia de Avila Botton, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 5 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Fernanda Silveira Flores Vogel, pela oportunidade, orientação, confiança, colaboração e pela amizade demonstrada em nosso convívio, em especial durante a execução desse trabalho.

Ao professor Luís Antônio Sangioni, pelos ensinamentos, companheirismo e pela amizade.

Aos meus pais Olavo e Lizete, pelo carinho e confiança em mim depositada, que mesmo relativamente longe sempre apoiaram as minhas decisões.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM, aos quais sempre pude ter como uma extensão da minha família, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade demonstrada.

A toda equipe do Setor de Virologia da UFSM, especialmente aos professores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores, pela oportunidade e conhecimentos oferecidos, e ao colega Marcelo Weiss pela disposição, paciência e auxílio durante a realização deste trabalho.

Venho agradecer em geral toda a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da USP, pelo material cedido e principalmente os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela formação acadêmica e científica.

A CAPES e CNPq pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos que contribuíram e torceram por mim.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

***Neospora caninum*: IMUNOGLOBULINAS COMO MARCADORES DE INFECÇÃO TRANSPLACENTÁRIA E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CULTIVOS CELULARES.**

AUTOR: GUSTAVO CAUDURO CADORE
ORIENTADOR: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Santa Maria, 5 de março de 2009.

A neosporose é uma doença parasitária de ampla distribuição e com grande importância para a bovinocultura, principalmente pelas perdas reprodutivas que determina. O ciclo do *Neospora caninum* caracteriza-se por apresentar três estágios infecciosos: os taquizoítos, os cistos teciduais contendo bradizoítos e os oocistos. Suas rotas de transmissão podem ser horizontal e/ou vertical. A infecção vertical ou transplacentária é a forma mais frequente de infecção, sendo uma importante forma de manutenção do agente nos rebanhos. Com o objetivo de determinar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em fetos bovinos, foram coletadas 260 amostras de soro em abatedouro localizado no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta com a presença de imunoglobulinas G e M (IgG e IgM), sendo analisada com ponto de corte de 1:25. Do número total de amostras testadas, 15% (39/260) foram positivas para anticorpos anti-*N. caninum*. Destas, em 38 (97,4%) foi detectada a presença de IgG anti-*N. caninum* e em seis (15,4%) de IgM. Em cinco amostras (12,8%) detectaram-se ambos, IgG e IgM. Os resultados reafirmam a capacidade do *N. caninum* determinar infecção fetal. Os resultados obtidos no primeiro capítulo desta dissertação permitiram demonstrar que a pesquisa

de IgM foi de limitada importância na detecção da infecção via transplacentária em soro fetal bovino. No segundo capítulo, foi avaliada a susceptibilidade à infecção pelo *N. caninum* em diferentes cultivos celulares, com a finalidade de observar a capacidade de multiplicação deste agente *in vitro*. Para isto, foram testados oito cultivos, sendo que quatro apresentaram boa susceptibilidade a multiplicação pelo *N. caninum*: células VERO (produção de 21,2 taquizoítos/célula), MA-104 (17,1), cultivo primário de testículo (16,3) e pulmão bovino (13,6). O cultivo primário de rim bovino (8,2), células MDBK (5,1) e RK-13 (0,4) apresentaram baixa sensibilidade, enquanto células MDCK não produziram taquizoítos viáveis. Os resultados obtidos demonstram que as células MA-104 apresentaram susceptibilidade semelhante a das células VERO – linhagem tradicionalmente utilizada para o cultivo deste protozoário. Pela facilidade de cultivo e rápida multiplicação, menor exigência nutricional e produção de taquizoítos em níveis semelhantes às células VERO, as células MA-104 demonstraram ser adequadas para a manutenção e multiplicação do *N. caninum in vitro*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; cultivo celular; células VERO; células MA-104; Imunoglobulinas G e M (IgG e IgM); fetos bovinos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

***Neospora caninum*: IMMUNOGLOBULIN AS MARKERS OF TRANSPLACENTALLY INFECTION AND EVALUATION OF SUSCEPTIBILITY IN CELL CULTURE.**

AUTHOR: GUSTAVO CAUDURO CADORE
ADVISER: FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
Santa Maria, March, 5th, 2009.

Neosporosis is a parasitic disease of wide distribution and great importance to the cattle industry, mainly due to its associated reproductive losses. The life cycle of *Neospora caninum* typified by the tree know infectious stages: tachyzoites, tissue cysts with bradyzoites, and oocysts. Transmission routes can be horizontal and/or vertical. The vertical transmission or transplacentally is the most frequent form of infection, and an important form of maintain the agent in herds. With aim of to determine the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in serum samples of 260 bovine fetuses, collected in a slaughter in the municipality of Santa Maria, in Rio Grande do Sul, Brazil. For detection antibodies anti-*N. caninum* indirect fluorescent antibody test was used and immunoglobulin G and M were detected, using a cut-off 1:25. Of the 260 serum samples tested, 15% (39/260) were positive for the presence of anti-*N. caninum*. Of these, in 38 the presence of IgG where detected (97.4%) and in six IgM were present (10.3%). Five samples (15.4%) tested were positive for both IgG and IgM. The results reaffirming the ability of *N. caninum* in determine fetal infection. The results presented on the first chapter indicated that the search of IgM anti-*N. caninum* is of very limited help in the detection of the transplacental infection in cattle. In second chapter, was evaluated the

susceptibility to infection by *N. caninum* in different cell cultures, for the purpose of observe the ability *in vitro* multiplication this agent. For this, eight cell cultures were tested, among the cell cultures tested, four presented good susceptibility to agent: cell lines VERO (yield of 21.2 tachyzoites/cell) and MA-104 (17.1); primary bovine testicle (16.3) and lung cells (13.6). Primary bovine kidney (8.2 tachyzoites/cell), MDBK (5.1) and RK-13 cell lines (0.4) presented moderate to low sensitivity. No viable tachyzoites were detected in the culture of MDCK cells. These results demonstrate that MA-104 cells present adequate susceptibility to *N. caninum* compared to VERO cells, which have been largely used to multiply the parasite *in vitro*. Due to the easy manipulation, quick multiplication and relatively low nutritional requirements, these results indicate that MA-104 cells are adequate for multiplication of *N. caninum in vitro*.

Key words: *Neospora caninum*, tissue culture, diagnostic, VERO, MA-104, immunoglobulin G and M (IgG and IgM), bovine fetuses.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Detecção de imunoglobulina G (IgG) e M (IgM) anti- <i>Neospora caninum</i> pela técnica de imunofluorescência indireta em amostras de soro de fetos bovinos coletadas em frigorífico, Santa Maria, RS, Brasil.....	26
--	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Média da produção de taquizoítos em 0,2 mL do <i>Neospora caninum</i> em diferentes cultivos celulares aos cinco, seis e sete dias após a inoculação, por repetição.....	36
TABELA 2. Produção média de taquizoítos do <i>Neospora caninum</i> ^a em diferentes cultivos celulares e desvio padrão (dp) aos cinco, seis e sete dias após a inoculação.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 CAPÍTULO 1. Detecção de imunoglobulinas G e M anti-<i>Neospora caninum</i> em fetos bovinos.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e métodos.....	20
Resultados e discussão.....	21
Agradecimentos.....	23
Referências.....	23
3 CAPÍTULO 2. Susceptibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao <i>Neospora caninum</i>.....	27
Resumo.....	28
Abstract.....	28
Referências.....	34
4 CONCLUSÕES.....	38
5 REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* é um parasita intracelular obrigatório, isolado pela primeira vez de filhotes de cães com encefalomielite nos Estados Unidos (DUBEY et al., 1988), porém seus primeiros relatos ocorreram em cães na Noruega (BJERKAS et al., 1984). Atualmente é reconhecido como uma das maiores causas de aborto e perdas neonatais em bovinos em todo o mundo tanto para bovinos de leite quanto de corte (ANDERSON et al., 2000; DUBEY; SCHARES, 2006). Este protozoário pertence ao filo Apicomplexa, família Sarcocistidae, com duas espécies descritas no gênero, o *N. caninum* (DUBEY et al., 1988), isolado de cérebro de cão, e o *N. hughesi* (MARSH et al., 1998), isolado de cérebro e medula espinhal de equino. O *N. caninum* permanece nos bovinos durante várias gerações, como uma infecção crônica, podendo ser transmitida via transplacentária ao feto (BARR et al., 1994; SCHARES et al., 1998), sendo morfológicamente semelhante ao protozoário *Toxoplasma gondii* (ANDERSON et al., 2000; DUBEY, 2003).

O ciclo do protozoário envolve três estágios infecciosos: bradizoítos, taquizoítos e oocistos contendo esporozoítos. Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios intracelulares encontrados no hospedeiro intermediário, enquanto os oocistos se desenvolvem nos hospedeiros definitivos, que são eliminados junto às fezes destes animais, ocorrendo esporulação no ambiente, com a formação de esporozoítos. Os taquizoítos são altamente infectantes, sendo que será essa a forma que irá fazer a infecção transplacentária (DUBEY, 2003). Os taquizoítos de *N. caninum* já foram detectados numa variedade de tecidos e tipos celulares, exibindo pouca especificidade de hospedeiro, infectando células nervosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos (HEMPHILL et al., 1999). Os bradizoítos

localizam-se no interior de cistos teciduais (DUBEY et al., 1988), onde o início da resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos induzem a entrada dos taquizoítos nas células e a diferenciação em bradizoítos, estabelecendo a infecção pela presença dos cistos, podendo persistir no hospedeiro infectado por vários anos, sem causar nenhuma manifestação clínica (PETERS et al., 2001).

Este protozoário pode difundir-se nos rebanhos através da transmissão horizontal, pela ingestão de oocistos que são excretados pelos hospedeiros definitivos ou pela transmissão vertical. Em bovino, a principal via de transmissão é a vertical, onde a infecção transplacentária pode determinar perdas reprodutivas ou a infecção fetal pode determinar no nascimento de bezerros normais clinicamente saudáveis, porém persistentemente infectados (PI) (TREES; WILLIAMS, 2005; DUBEY, et al. 2007).

Atualmente, são reconhecidos como hospedeiros definitivos os cães (MCALLISTER et al., 1998) e os coiotes (GONDIM et al., 2004). Os hospedeiros definitivos excretam oocistos do protozoário nas fezes, que após esporulação poderão ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários. Nos hospedeiros intermediários, ocorrerá a formação de cistos teciduais, com o ciclo completando-se quando algum hospedeiro definitivo ingerir tecidos do hospedeiro intermediário que contenham os cistos. Os cães e os coiotes podem também servirem de hospedeiros intermediários, infectando-se com seus próprios oocistos eliminados pelas fezes (PARÉ et al., 1996; SARTOR et al., 2005). Para os bovinos, a principal fonte de infecção não se dá através da ingestão dos oocistos esporulados e sim através da infecção vertical, onde durante a gestação de fêmeas soropositivas, pode ocorrer a reativação do protozoário dos cistos teciduais e infecção transplacentária. As conseqüências da infecção transplacentária são as mais diversas, podendo ocorrer morte embrionária ou aborto, refletidas como retorno ao cio com intervalo regular ou irregular, nascimento de bezerros frágeis, com sinais nervosos ou nascimento de

bezerros PI (DUBEY et al., 2002). A idade da mãe, número de lactações e histórico de problema reprodutivo são fatores que não afetam a taxa de infecção transplacentária, onde fêmeas bovinas são as mais importantes na epidemiologia desta enfermidade, sendo que através da transmissão vertical são estas que vão manter o protozoário no rebanho, estimando-se que até 95% dos animais nascidos de vacas soropositivas são clinicamente sadios, porém com infecção persistente (DUBEY et al., 2002).

Os animais PI são clinicamente normais, porém soropositivos, abrigando o parasita encistado em seus tecidos, mais comumente em células do sistema nervoso, sendo assim considerados portadores do agente (SPEER; DUBEY, 1989). A reativação da infecção nas fêmeas prenhes infectadas ocorre, provavelmente, através da imunossupressão fisiológica da gestação, podendo resultar na transmissão transplacentária do agente ao feto, uma vez que através da transmissão vertical são estas que vão manter o protozoário no rebanho (INNES et al., 2002). Durante este processo de reativação, o protozoário deixa os cistos teciduais na forma de taquizoítos que vão fazer a infecção transplacentária e atingir o embrião ou o feto (GUY et al., 2001).

Na reprodução os efeitos da infecção são caracterizados por alta taxa de mortalidade embrionária durante o primeiro terço gestacional e aborto durante o segundo trimestre. No terço final de gestação a infecção normalmente não acarreta em morte fetal e aborto, mas sim no nascimento de bezerros saudáveis, porém PI, o que também pode acontecer no segundo terço gestacional (BIELSA et al., 2005). Duas categorias de aborto podem ocorrer: a forma epidêmica, com alta porcentagem de animais abortando em poucas semanas, e a forma endêmica com os abortos ocorrendo durante meses ou anos (WOUDA et al., 1998).

A avaliação de estudos soroepidemiológicos demonstra que a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* pode variar entre 6,8% (COSTA et al., 2001) a 65,5% (CORBELLINI et al.,

2002). Esta ampla variação é em decorrência de alguns fatores como: i. tipo de amostragem utilizada; ii. população estudada; iii. histórico ou não de problemas reprodutivos (SARTOR et al., 2005); iv. vacinação do rebanho. Os primeiros relatos da detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos no país foram por BRAUTIGAM et al. (1996) em bovinos de leite nos Estados de São Paulo e em bovinos de corte no Mato Grosso do Sul. No Rio Grande do Sul, CORBELLINI et al. (2002) determinaram através da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) a prevalência de 11,2 % para o *N. caninum* em uma amostragem de 223 animais. Já RAGOZO et al. (2003) pela mesma técnica encontraram 20% de animais soropositivos, analisando amostras de soro de 140 bovinos neste estado. O primeiro relato confirmado de infecção ocorreu no estado da Bahia, em um feto bovino abortado com aproximadamente oito meses, de uma propriedade leiteira, onde vinham ocorrendo abortos (GONDIM et al. 1999), e o seu primeiro isolamento, ocorreu a partir do cérebro de um cão com sete anos de idade que apresentava neuropatia, com incoordenação e paresia de membros posteriores (GONDIM et al., 2000).

O diagnóstico para neosporose pode ser realizado através de técnicas que permitam a detecção de lesões, o isolamento e identificação do protozoário, detecção de ácidos nucléicos ou a demonstração de anticorpos específicos para o *N. caninum* em fluídos fetais (SILVA, 2005). Os materiais de eleição para diagnóstico de aborto por *N. caninum* em fetos abortados são: placenta, líquidos fetais, cérebro, coração e fígado (DUBEY et al., 2002). Em adultos, o diagnóstico laboratorial é obtido através da detecção de anticorpos específicos no soro sanguíneo, soro do leite ou colostro de vacas infectadas, assim como em fluídos vaginais e na saliva (OOI et al., 2000). Neste sentido, vários métodos sorológicos já foram descritos como, IFI, ensaio imunoenzimático (ELISA), aglutinação direta e imunoblotting (JENKINS et al., 2002; HOANE et al., 2006). O primeiro método sorológico aplicado em animais para o diagnóstico de *N. caninum* foi a IFI,

utilizando taquizoítos como antígenos, sendo este considerado um método de referência para diagnóstico sorológico (HEMPHILL et al., 2000).

Achados de anticorpos contra o *N. caninum* em fetos pode estabelecer um diagnóstico de infecção transplacentária, mas um resultado negativo pode não ser informativo, devido a formação de resposta imunológica fetal depender de seu estágio gestacional, nível de exposição e tempo entre infecção e aborto (DUBEY, 2003). Também se deve ter cuidado na interpretação de resultados sorológicos em bovinos na faixa etária entre 13 e 24 meses de idade, devido a possibilidade de ocorrer resultados falso negativos, pelo declínio de anticorpos nesta idade em animais infectados congenitamente (HIETALA; THURMOND, 1999). Em bovinos adultos, HÄSLER et al. (2006), detectaram um aumento significativo nos níveis séricos de anticorpos anti-*N. caninum* no último mês de gestação, onde PARÉ et al. (1996), observaram vacas que apresentavam altos níveis séricos de anticorpos durante o final da prenhez ou um aumento na sua quantidade entre o 3º e o 8º mês de gestação, apresentavam maior probabilidade de transmitir neosporose congenitamente quando comparadas com aqueles animais com baixos níveis de anticorpos ou com níveis decrescentes.

Para indicar o *N. caninum* como agente causador de aborto não se pode apenas detectar o agente ou seus ácidos nucléicos, mas também a presença de lesões características através da histopatologia (ANDERSON et al., 1991), como: encefalite multifocal não supurativa, necrose focal do miocárdio, miocardite não supurativa, com posterior identificação do agente por imunohistoquímica (DUBEY et al., 2006; PESCADOR et al., 2007). Se o exame do soro materno, fluídos corporais fetais ou tecidos fetais é positivo ao *N. caninum* pela sorologia ou PCR, o aborto pode estar associado ao *N. caninum*, mas é importante relacionar outras causas potenciais. Se as lesões no cérebro e coração são graves e os taquizoítos de *N. caninum* estão presentes nas lesões, muito provavelmente a causa do aborto é devido à neosporose (DUBEY e SCHARES, 2006).

A transmissão do *N. caninum* pela via venérea ou por transferência de embriões é improvável, não existindo nenhum relato deste tipo de transmissão. Neste sentido, a transferência de embriões pode ser recomendada como uma das formas de controle da transmissão vertical utilizando-se doadoras soropositivas e receptoras soronegativas (BAILLARGEON et al., 2001). Ainda quanto ao controle e profilaxia da neosporose, recomenda-se: identificar e descartar as fêmeas soropositivas, realizando a reposição com fêmeas soronegativas ao agente; nas propriedades com animais negativos ao *N. caninum*, impedir a entrada de fêmeas positivas; proteger a ração e a água dos bovinos contra contaminação pelas fezes de cães e outros hospedeiros definitivos, bem como impedir que estes possam ingerir fetos abortados ou membranas fetais, realizando a remoção de tecidos potencialmente infectantes do ambiente (DUBEY, 1999; DUBEY et al, 2007).

2 CAPÍTULO 1

Detecção de imunoglobulinas G e M anti-*Neospora caninum* em fetos bovinos.

Detection of anti-*Neospora caninum* immunoglobulin G and M in bovine fetuses.

**Gustavo C. Cadore¹, Fernanda S. F. Vogel^{2*}, Luis Antonio Sangioni², Sandra Arenhart¹,
Hilda F. J. Pena³, Solange M. Gennari³**

(Artigo submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 2008)

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Rua Roraima, 1000 – Camobi – Santa Maria – RS. Bolsista CAPES.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), UFSM. *Autor para correspondência - Rua Roraima 1000 – Camobi – Santa Maria – RS. E-mail: fervogel@smail.ufsm.br

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP). Rua Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87. Cidade Universitária. CEP 05508-270 – São Paulo.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em 260 amostras de soro coletadas de fetos bovinos de julho de 2007 a março de 2008, em abatedouro do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Para detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta e a presença de imunoglobulinas G e M foi analisada com ponto de corte de 1:25. Das 260 amostras testadas, 15% (39/260) foram positivas para anticorpos anti-*N. caninum*. Destas, em 38 (97,4%) foi detectada a presença de IgG anti-*N. caninum* e em seis (15,4%) de IgM. Em cinco amostras (12,8%) detectaram-se ambos, IgG e IgM. Os resultados reafirmam a habilidade do *N. caninum* em determinar infecção fetal. A pesquisa de IgM foi de limitada importância na detecção da infecção via transplacentária em soro fetal bovino.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, Imunofluorescência indireta, fetos bovinos, Imunoglobulinas G e M (IgG e IgM).

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in serum samples of 260 bovine fetuses, collected from July 2007 to March 2008 in a slaughter in the municipality of Santa Maria, in Rio Grande do Sul, Brazil. For detection antibodies anti-*N. caninum* indirect fluorescent antibody test was used and immunoglobulin G and M were detected, using a cut-off 1:25. Of the 260 serum samples tested, 15% (39/260) were positive for the

presence of anti-*N. caninum*. Of these, in 38 the presence of IgG were detected (97.4%) and in six IgM were present (10.3%). Five samples (15.4%) tested were positive for both IgG and IgM. The results reaffirming the ability of *N. caninum* to determine fetal infection. The search of IgM anti-*N. caninum* is of very limited help in the detection of the transplacental infection in cattle.

KEY WORDS: *Neospora caninum*, indirect fluorescent antibody test, bovine fetuses, immunoglobulin G and M (IgG and IgM).

INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário intracelular *Neospora caninum* (Apicomplexa, Sarcocystidae), relatado primeiramente em cães na Noruega (BJERKAS et al., 1984). Desde então, relatos da infecção por este agente tem sido descritos em várias espécies, incluindo ruminantes (DUBEY & LINDSAY, 1996). Em bovinos, a infecção é caracterizada pelo comprometimento reprodutivo em fêmeas, podendo causar abortos em qualquer estágio de gestação, porém mais comumente durante o quinto e o sexto mês de gestação, podendo ocorrer repetidas vezes durante a vida reprodutiva destes animais (MORALES et al., 2001a; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2002).

Achados de anticorpos contra o *N. caninum* em fetos pode determinar a ocorrência da infecção por este protozoário, no entanto, a resposta imunológica depende do estágio de desenvolvimento fetal, do nível de exposição e do tempo entre a infecção e a coleta de sangue (DUBEY, 2003). Por outro lado, a presença de anticorpos assegura a ocorrência de infecção transplacentária deste agente sem interferência da imunidade passiva.

Este estudo teve como objetivo determinar a ocorrência da infecção transplacentária pelo *N. caninum*, através da detecção das imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM) anti-*N. caninum* em amostras de soro fetal de bovinos, coletados em abatedouro do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 260 fetos, independente do estágio de gestação, histórico de problema reprodutivo e de vacinação contra *N. caninum* no rebanho, foram coletados em frigorífico na cidade de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, durante o período de julho de 2007 a março de 2008.

A coleta das amostras foi realizada na linha de abate através de punção da veia jugular ou diretamente do coração. As amostras foram identificadas individualmente, centrifugadas e o soro armazenado em tubos do tipo *ependorf* a -20°C .

As amostras de soro foram submetidas à pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* através da técnica de imunofluorescência indireta com taquizoítos da cepa NC-1, conforme metodologia descrita por Dubey et al. (1988) e Paré et al. (1995). As amostras de soro foram diluídas em 1:25 (WOUDA et al., 1997a) e testadas para a presença de imunoglobulinas G e M. Como anticorpo secundário, utilizou-se IgG e IgM caprinas anti-bovino conjugadas com fluoresceína (KPL, Gaithersburg, USA), considerou-se positivas as reações que mostraram os taquizoítos com toda sua superfície fluorescente (CONRAD et al., 1993; PARÉ et al., 1995). Em cada lâmina testada, controles negativo e positivo foram utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontram-se apresentados na tabela 1. Das 260 amostras testadas, em 39 detectou-se a presença de anticorpos anti-*N. caninum*. Destas 39, IgG foi detectado em 38 amostras (97,4%) e em seis detectou-se IgM (15,4%). Das amostras positivas para *N. caninum* em 33 (84,6%) somente anticorpos tipo IgG foram encontrados, em cinco (12,8%) ambas imunoglobulinas estavam presentes e apenas em uma amostra (2,6%) foi detectada somente a presença de IgM.

O valor de ocorrência foi de 15% quando medido pela pesquisa de IgG e IgM e de 14,6% quando utilizou-se somente a pesquisa de IgG, indicando pequena utilidade do uso da IgM como complementar para aumentar a sensibilidade do diagnóstico sorológico do *N. caninum* em fetos bovinos.

Resultados semelhantes foram observados por Wouda et al. (1997b) na Holanda que examinaram soro de 2053 fetos e encontraram 17% de positividade. Na Alemanha, (SONDGEN et al. 2001) a ocorrência foi de 12,6% em 135 fetos, e na Argentina, Moore et al. 2002 detectaram ocorrência de 12,1% em 240 fetos examinados através da técnica de imunohistoquímica. Outros estudos demonstram alta prevalência de anticorpos, Morales et al. (2001b), no México encontraram 77% em 211 fetos examinados; nos Estados Unidos, Anderson et al. 1995, encontraram 42,5% (266 fetos). No entanto no Brasil Corbellini et al. (2002) demonstraram a presença de antígenos do *N. caninum*, através da técnica de imunohistoquímica, em 81,8% dos fetos analisados. Deve-se considerar que estes fetos eram provenientes de propriedades com histórico de problemas reprodutivos, o que poderia justificar essa diferença na prevalência encontrada. Variações de prevalência podem ser encontradas dependendo da amostragem utilizada.

Sabe-se que tanto a presença de IgG como de IgM anti- *N. caninum* podem servir de marcadores da infecção transplacentária em amostras de soro de fetos bovinos. Neste estudo, a prevalência encontrada analisando-se em separado IgG e IgM foi de 14,6% e de 2,3% respectivamente. A imunoglobulina M é mais precocemente encontrada após a infecção aguda. Serrano et al. (2006) demonstraram que após a infecção experimental intrauterina de novilhas, níveis de IgM e IgG foram detectados, no soro destes animais, a partir do dia 15 e 18 pós inoculação (pi) respectivamente. A partir dos achados deste estudo pode-se concluir que somente 2,3% dos fetos avaliados haviam sido recentemente infectados.

Em outros estudos de patogenia da infecção pelo *N. caninum*, observa-se que a cinética de detecção de IgM e IgG no soro, durante a infecção aguda, parece não diferir muito. Vacas prenhes inoculadas aos 140 dias de gestação com taquizoítos apresentaram picos de IgG também no dia 35 pi, mantendo títulos elevados até o final do estudo, a presença de IgG e IgM foi analisada nos fetos que começaram a apresentar anticorpos específicos a partir dos 42 dias pi (BARTLEY et al., 2004). De MAREZ et al. (1999) compararam os níveis séricos de IgM e IgG em bezerros, demonstrando que em animais infectados experimentalmente com oocistos de *N. caninum*, níveis detectáveis de ambas imunoglobulinas ocorreram a partir de duas semanas após a infecção, com os níveis de IgM declinando trinta dias após a infecção, e os de IgG alcançando níveis máximos neste período.

Os resultados obtidos demonstram que o protozoário *N. caninum* é capaz de estabelecer infecção fetal, que a infecção por este protozoário está disseminada no rebanho bovino do Rio Grande do Sul e que em estudos com amostras fetais a pesquisa de IgM anti- *N. caninum* parece não aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.L.; PALMER, C.W.; THURMOND, M.C.; PICANSO, J.P.; BLANCHARD, P.C.; BREITMEYER, R.E.; LAYTON, A.W.; MCALLISTER, M.; DAFT, B.; READ, D.H.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.207, p.1206-1210, 1995.

BARTLEY, P.M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN, I.; BUXTON, D.; MALEY, S.W.; SCHOCK, A.; RAE, A.G.; HAMILTON, C.; INNES, E.A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, v.130, p.81-91, 2004.

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

CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; ROWE, J.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A.; DUBEY, J.P.; DUHAMEL, G.; BARR, B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.5, p.572-578, 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, n.3, p.195-202, 2002.

De MAREZ, T.; LIDDELL, S.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.1647-1657, 1999.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission of *Neospora caninum*. *Journal American Veterinary Association*, v.193, p.1259-1263, 1988.

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

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

GARCIA-VAZQUEZ, Z.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; MEDINA, E.L.; GARCIA, T.D.; CHAVARRIA, M.B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*, v.106, p.115-120, 2002.

MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEÓN, A.C.; POSSO, M.A.; CANO, D.; LUENDA, M.R.; BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; SPATH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.107, p.303-316, 2002.

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 Comparative Pathology*, v.125, p.58-63, 2001a.

MORALES, E.; TRIGO, F.J.; IBARRA, F.; PUENTE, E.; SANTACRUZ, M. Seroprevalence study of bovine Neosporosis in Mexico. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, p.413-415, 2001b.

PARÉ, J.; HIETALA, S.K.; THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, n.2, p.273-275, 1995.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTINEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Veterinary Parasitology*, v.135, p.197-203, 2006.

SONDGEN, P.; PETERS, M.; BÄRWALD, A.; WURM, R.; HOLLING, F.; CONRATHS, F.J.; SCHARES, G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Veterinary Parasitology*, v.102, n.4, p.279-290, 2001.

WOUDA, W.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *Journal Parasitology*, v.83, p.545-547, 1997a.

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

Tabela 1 – Detecção de imunoglobulina G (IgG) e M (IgM) anti-*Neospora caninum* pela técnica de imunofluorescência indireta em amostras de soro de fetos bovinos coletadas em frigorífico, Santa Maria, RS, Brasil.

IgG			
IgM	Positivo (%)	Negativo (%)	Total (%)
Positivo (%)	5 (1,9)	1 (0,4)	6 (2,3)
Negativo (%)	33 (12,7)	221 (85)	254 (97,7)
Total	38 (14,6)	222 (85,4)	260 (100)

3 CAPÍTULO 2

Susceptibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao *Neospora caninum*.

Susceptibility of cell lines and primary cell cultures to *Neospora caninum*.

Gustavo Cauduro Cadore¹ Giovana Camillo² Luis Antônio Sangioni³

Eduardo Furtado Flores³ Fernanda Silveira Flores Vogel^{3*}

(Nota submetida à Ciência Rural, 2008)

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

² Graduação em Medicina Veterinária, UFSM. Bolsista CNPq/PIBIC.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM. Fone: 55-3220-8071. E-mail: fervogel@smail.ufsm.br. *Autor para correspondência.

RESUMO

O *Neospora caninum* é um protozoário de ampla distribuição e grande importância na bovinocultura, principalmente pelas perdas reprodutivas que produz. Cultivos celulares são utilizados para o isolamento e multiplicação do agente *in vitro*, com diversas finalidades. Este trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade de diferentes cultivos celulares à infecção pelo *N. caninum*. Dentre oito cultivos testados, quatro apresentaram boa susceptibilidade ao *N. caninum*: células VERO (produção de 21,2 taquizoítos/célula), MA-104 (17,1), cultivo primário de testículo (16,3) e pulmão bovino (13,6). Cultivo primário de rim bovino (8,2), células MDBK (5,1) e RK-13 (0,4) apresentaram baixa sensibilidade; enquanto células MDCK não produziram taquizoítos viáveis. Os resultados obtidos demonstram que as células MA-104 apresentaram susceptibilidade semelhante a das células VERO – linhagem tradicionalmente utilizada para o cultivo deste protozoário. Pela maior facilidade de cultivo e rápida multiplicação, menor exigência nutricional e produção de taquizoítos em níveis semelhantes às células VERO, as células MA-104 demonstraram ser adequadas para a manutenção e multiplicação do *N. caninum in vitro*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, cultivo celular, diagnóstico, células VERO, células MA-104.

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan of wide distribution and great importance to the cattle industry, mainly due to its associated reproductive losses. Cultured cells are widely used for

isolation and multiplication of the agent *in vitro* with several purposes. Thus, this study was designed to evaluate the susceptibility of different cell cultures to infection by *N. caninum*. Among the cell cultures tested, four presented good susceptibility to the agent: cell lines VERO (yield of 21.2 taquizoites/cell) and MA-104 (17.1); primary bovine testicle (16.3) and lung cells (13.6). Primary bovine kidney (8.2 taquizoites/cell), MDBK (5.1) and RK-13 cell lines (0.4) presented moderate to low sensitivity. No viable taquizoites were detected in the culture of MDCK cells. These results demonstrate that MA-104 cells present adequate susceptibility to *N. caninum* compared to VERO cells, which have been largely used to multiply the parasite *in vitro*. Together with its easy manipulation, fast multiplication and relatively low nutritional requirements, these results indicate that MA-104 cells are adequate for multiplication of *N. caninum in vitro*.

Key words: *Neospora caninum*, tissue culture, diagnostic, VERO, MA-104.

A neosporose é uma doença causada pelo protozoário intracelular *Neospora caninum* (Apicomplexa, Sarcocystidae), relatado inicialmente em cães na Noruega (BJERKAS et al., 1984). Desde então, este agente tem sido descrito em várias espécies animais, incluindo ruminantes (DUBEY & LINDSAY, 1996). Em bovinos, a infecção é caracterizada por perdas reprodutivas em fêmeas, podendo resultar em mortalidade embrionária durante o primeiro terço gestacional e abortos durante o segundo trimestre. No terço final da gestação, a infecção geralmente não acarreta morte fetal e abortos, mas sim a produção de bezerros saudáveis, porém, persistentemente infectados, o que também pode ocorrer no segundo terço da gestação (DUBEY, 2003). Na maioria dos animais a infecção não induz imunidade sólida e duradoura, e as

conseqüências reprodutivas da infecção podem ocorrer repetidas vezes durante a vida dos animais infectados (MORALES et al., 2001; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2002).

O ciclo biológico do *N. caninum* foi esclarecido por MCALLISTER et al. (1998) e envolve hospedeiros definitivos e intermediários. Os primeiros abrigam o agente e se caracterizam por excretar oocistos nas fezes, os quais esporulam no ambiente e são infectantes para os hospedeiros intermediários. Estes por sua vez, ingerem os oocistos esporulados e desenvolvem cistos teciduais. O protozoário consegue se disseminar nos rebanhos por transmissão horizontal, através da ingestão de oocistos excretados pelos hospedeiros definitivos, após a esporulação no meio ambiente. A transmissão vertical, da vaca gestante para o feto, assume papel importante na manutenção do protozoário em rebanhos, pois a maioria das infecções congênicas resulta no nascimento de bezerros persistentemente infectados (TREES & WILLIAMS, 2005).

O controle e profilaxia da Neosporose Bovina dependem de técnicas de diagnóstico adequadas, para a identificação dos animais portadores e para o diagnóstico de perdas reprodutivas pelo agente. Várias técnicas têm sido utilizadas com esta finalidade, tanto para diagnóstico quanto em pesquisa, para estudos de patogenia e estudos soroepidemiológicos. Neste sentido, os cultivos celulares são de grande importância, tanto para isolamento e diagnóstico do agente, como para a sua multiplicação *in vitro* com diversas finalidades. A realização da técnica de imunofluorescência indireta, por exemplo, é dependente da multiplicação do agente em cultivos (DUBEY, 2003; HEMPHILL et al., 2004).

A linhagem celular VERO (*African Green monkey kidney*) é a mais utilizada para a propagação do agente *in vitro* (DUBEY, 2003). No entanto, o cultivo destas células por vezes apresenta dificuldades, principalmente no que se refere à velocidade de multiplicação e nível de exigência de componentes nutricionais do meio de cultivo. Por isso, a disponibilidade de outros cultivos celulares susceptíveis ao parasita seria de grande interesse e utilidade para o diagnóstico e

pesquisa do *N. caninum*. Assim, este trabalho teve por objetivo testar a susceptibilidade de diferentes linhagens celulares e cultivos primários ao *N. caninum*.

Para isto, taquizoítos da cepa NC-1 do *N. caninum* (gentilmente cedida pela Dra. Solange Gennari, USP) foram inoculados em oito cultivos celulares: cultivo primário de rim, pulmão e testículo bovino; células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*), MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), RK-13 (*rabbit kidney*), MA-104 (*African Green Monkey kidney cells*) e VERO (*African Green Monkey kidney cells*).

Os cultivos primários foram produzidos a partir de tecidos obtidos de um feto bovino coletado em frigorífico, segundo FRESHNEY (1987). As células MDBK, MDCK, RK-13, MA-104 e VERO pertenciam ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria.

Cada cultivo celular foi mantido em garrafas plásticas de 25cm² em MEM (meio essencial mínimo), exceto as células VERO (mantidas em RPMI), sendo todas suplementadas com 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37°C. Quando o tapete de células atingia sua confluência, eram realizadas contagens do número de células por garrafa (células por cm²), para isto, as células eram tripsinizadas e diluídas em solução contendo azul de trypan com a contagem realizada em câmara de Neubauer, segundo recomendações de FRESHNEY (1987). Para cada cultivo celular foram realizadas três contagens, sendo o resultado expresso em uma média.

Para avaliação da susceptibilidade de cada cultivo, as células foram inoculadas com o título final de 5×10^5 taquizoítos para cada cultivo testado. Alíquotas de cada cultivo inoculado foram coletadas nos dias 5, 6 e 7 após a infecção para contagem do número de taquizoítos. A produção de taquizoítos foi avaliada em triplicata (três cultivos independentes, com três contagens de taquizoítos cada) nas células RK-13, MA-104, MDBK, MDCK e VERO; e em duplicata nos cultivos primários (dois experimentos, três contagens de taquizoítos cada). A contagem dos taquizoítos foi realizada em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em número médio de

taquizoítos por 0,2mL, que correspondem a 1cm² do tapete celular. Os valores médios da produção de taquizoítos nas três (ou duas) repetições para cada dia estão apresentados na tabela 1, os valores médios com seus respectivos desvios padrão estão apresentados na tabela 2.

Dos cultivos testados, o que apresentou maior susceptibilidade foi o de células VERO (produção média de 21,2 taquizoítos/célula, mensurado no dia 7 pi) seguido pelas células MA-104 (17,1), do cultivo primário de testículo (16,3) e pulmão bovino (13,6). Pela produção de taquizoítos em títulos semelhantes, estes quatro cultivos mostram-se adequados à multiplicação e manutenção da cepa NC-1. Por outro lado, o cultivo primário de rim bovino (8,2), células MDBK (5,1) e RK-13 (0,4) apresentaram moderada a baixa susceptibilidade, não sendo indicados para a multiplicação desta cepa do protozoário, bem como as células MDCK, que não produziram taquizoítos viáveis.

A utilização de cultivos celulares altamente susceptíveis ao *N. caninum* é indispensável tanto para o diagnóstico quanto para a pesquisa. Os cultivos celulares permitem a manutenção e multiplicação dos taquizoítos deste protozoário, assim como o estudo de características celulares, estruturais e moleculares do agente (HEMPHILL et al., 2004). Assim como o *Toxoplasma gondii*, o cultivo do *N. caninum* pode utilizar diferentes tipos de células, incluindo cultivos primários e linhagens celulares, sendo que a susceptibilidade das células ao protozoário pode variar conforme a origem das células (HEMPHILL, 1999). Cultivos de células VERO, de células endoteliais da artéria aorta e queratinócitos de murinos já foram utilizados para a multiplicação do *N. caninum* (HEMPHILL et al., 2004). O cultivo de células VERO é o mais utilizado na rotina para o cultivo do *N. caninum in vitro* (DUBEY, 2003).

Lei et al. (2005), avaliaram a capacidade do *N. caninum* de infectar 4 cultivos celulares – linhagem de fibroblasto canino, fibroblasto canino, células VERO e células de rim de felinos – foi avaliada através do monitoramento dos cultivos infectados pela técnica de imunofluorescência.

Os resultados demonstraram que este protozoário foi capaz de invadir estes diferentes tipos de cultivos celulares. No entanto, estes autores não avaliaram a utilização destes cultivos para produção e manutenção deste protozoário.

A hipótese inicial do presente estudo era de que os cultivos primários pudessem apresentar uma susceptibilidade maior à infecção – o que resultaria em títulos superiores -, por possuírem um fenótipo semelhante ao das células do hospedeiro. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que as linhagens VERO e MA-104 produziram maior número de taquizoítos/célula. Isto pode ser explicado pelo fato da cepa NC-1 estar adaptada ao cultivo de células VERO. Assim, para a multiplicação desta cepa de *N. caninum* para diversas finalidades, podem ser utilizadas tanto as células VERO quanto as MA-104. O cultivo primário de células de testículo de bovino, utilizado neste estudo, produziu quantidades consideráveis de taquizoítos e, também pode ser utilizado com esta finalidade. Dentre estes três cultivos, a escolha dependerá da facilidade de manutenção e manipulação destas células *in vitro*. Neste quesito, a escolha provavelmente cairá sobre as células de linhagem (VERO e MA-104). Nas condições do laboratório onde foi realizado o estudo, as células MA-104 têm apresentado um padrão de multiplicação mais constante e, por isso, têm sido adotadas para a multiplicação do parasita.

Cabe ressaltar que os estudos de susceptibilidade foram realizados com uma cepa já adaptada em linhagens celulares. Os resultados destes testes não se aplicam necessariamente a isolados de campo, que podem potencialmente se multiplicar em níveis diferentes de acordo com o cultivo utilizado. Assim, com a finalidade de isolamento, recomenda-se testar a susceptibilidade destes e de outros cultivos a isolados de campo ainda não adaptados ao cultivo *in vitro*. É possível que amostras de campo multipliquem com mais eficiência em células primárias. Desta forma, estudos posteriores são necessários para a validação de cultivos primários para o isolamento de amostras de campo.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo demonstram que os cultivos de células VERO e MA-104 apresentaram maior susceptibilidade do que os demais, sendo indicados para a multiplicação *in vitro* da cepa NC-1. Nesse sentido, as células MA-104 se apresentam como alternativa viável para o cultivo do parasita *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rudi Weiblen por disponibilizar o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BJERKAS, I. et al. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.70, p.271-274, 1984.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 2.ed. New York : Wiley-Liss, 1987. 397p.

GARCIA-VAZQUEZ, Z. et al. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.115-120, 2002.

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v.43, p. 47-104, 1999.

HEMPHILL, A. et al. Tissue culture and explants approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. **Microscopy Microanalysis**, v.10, p. 602-620, 2004.

LEI, Y. et al. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines *in vitro*. **Parasitology**, v. 131, p. 583–590, 2005.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.

MORALES, E. et al. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. **Journal Comparative Pathology**, v.125, p.58-63, 2001.

TREES, A.J., WILLIAMS, D.J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.21, p.558-561, 2005.

Tabela 1 – Média da produção de taquizoítos em 0,2 mL do *Neospora caninum* em diferentes cultivos celulares aos cinco, seis e sete dias após a inoculação, por repetição.

	Primário de rim bovino	Primário de pulmão bovino	Primário de testículo bovino	Células VERO	Células MDBK	Células MA-104	Células RK-13	Células MDCK
Dia 5								
E1 ^a	2 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁴	0,8 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴	---- ^c	3,5 x 10 ⁴
E2	1,5 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	----	5,8 x 10 ⁴
E3	NR ^b	NR	NR	6 x 10 ⁴	0,5 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴	----	4,7 x 10 ⁴
Dia 6								
E1	4,2 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴	7 x 10 ⁴	----	----
E2	3,5 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴	6,2 x 10 ⁴	5 x 10 ³	----
E3	NR	NR	NR	7,5 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴	7,7 x 10 ⁴	5 x 10 ³	----
Dia 7								
E1	1,7 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	8,7 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	----
E2	1,9 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	9 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁴	----
E3	NR	NR	NR	1,8 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	8 x 10 ³	----

^a Número de repetições para cada cultivo celular. Experimento 1 (E1), 2 (E2) e 3 (E3). Os resultados para cada dia estão expressos na média das três contagens realizadas.

^bNão realizado ^ccontagem negativa

Tabela 2 – Produção média de taquizoítos do *Neospora caninum*^a em diferentes cultivos celulares e desvio padrão (dp) aos cinco, seis e sete dias após a inoculação.

Cultivo	Nº de células/cm ²	Taquizoítos/0,2mL (dp)			Nº taquizoítos / célula ^b
		Dia 5pi	Dia 6pi	Dia 7pi	
Primário de rim bovino	2,2 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴ (±2 x 10 ³)	3,8 x 10 ⁴ (±3 x 10 ³)	1,8 x 10 ⁵ (±7 x 10 ³)	8,2
Primário de pulmão bovino	1,4 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴ (----)	4 x 10 ⁴ (±2 x 10 ³)	1,9 x 10 ⁵ (±7 x 10 ³)	13,6
Primário de testículo bovino	9 x 10 ³	2 x 10 ⁴ (±2 x 10 ³)	3,3 x 10 ⁴ (±4 x 10 ³)	1,5 x 10 ⁵ (±7 x 10 ³)	16,3
Células VERO	8 x 10 ³	5,2 x 10 ⁴ (±6 x 10 ³)	8 x 10 ⁴ (±3 x 10 ³)	1,7 x 10 ⁵ (±4 x 10 ³)	21,2
Células MDBK	1,7 x 10 ⁴	8 x 10 ³ (±2 x 10 ³)	4,5 x 10 ⁴ (±4 x 10 ³)	8,7 x 10 ⁴ (±2 x 10 ³)	5,1
Células MA-104	8 x 10 ³	2,2 x 10 ⁴ (±1 x 10 ³)	7 x 10 ⁴ (±5 x 10 ³)	1,3 x 10 ⁵ (±4 x 10 ³)	17,1
Células RK-13	3,4 x 10 ⁴	-----	5 x 10 ³ (----)	1,2 x 10 ⁴ (±3 x 10 ³)	0,4
Células MDCK	2,4 x 10 ⁴	4,7 x 10 ⁴ (±8 x 10 ³)	-----	-----	-----

^a Estimada pela contagem comparativa do número de células e da quantidade de taquizoítos obtidos nos dias 5, 6 e 7 pós inoculação (pi).

^b Para esta relação, foi considerado que 0,2mL correspondem a 1cm². Contagem realizada no dia 7.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o protozoário *Neospora caninum* é capaz de estabelecer infecção fetal e que a infecção por este protozoário está disseminada no rebanho bovino do Rio Grande do Sul;

A detecção de imunoglobulinas da classe M (IgM) em amostras de soro fetal bovino parece não aumentar significativamente a sensibilidade do diagnóstico;

Os cultivos de células VERO e MA-104 apresentam maior susceptibilidade ao *N. caninum*;

Os cultivos de células VERO e MA-104 são indicados para a multiplicação e manutenção *in vitro* da cepa NC-1;

Células MA-104 podem ser utilizadas como alternativa viável para o cultivo do parasita *in vitro*.

5 REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 198, n. 2, p. 241-244, Jan, 1991.

ANDERSON, M. L. et al. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, n. 2, p. 417-431, Jul, 2000.

BAILLARGEON, P. G. et al. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, n. 11, p. 1803-1806, Jun, 2001.

BARR, B. C. et al. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the non human primate. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 71, n. 2, p. 236-242, Ago, 1994.

BIELSA, J. M. et al. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis^o Neoguard: a experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 34-37, Jul/Dez, 2005.

BJERKAS, I. et al. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Heidelberg, v. 70, n. 2, p. 271-274, Mar, 1984.

BRAUTIGAM, F. E. et al. Resultados de levantamento sorológico para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 1996, Campo Grande. **Anais ...**, Campo Grande, 1996, p. 284.

CORBELLINI, L. G. et al. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-202, Jan, 2002.

COSTA, G. H. N. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 57-62, Jan/Jun, 2001.

DUBEY, J. P. et al. 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. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 214, n. 8, p. 1160–1163, Abr, 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. **Korean Journal Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, Mar, 2003.

DUBEY, J. P. et al. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 134, n. 4, p. 267-289, Maio, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 2, p. 1-34, Ago, 2006.

DUBEY, J. P.; et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323- 367, Abr/Jun, 2007.

GONDIM, L. F. P. et al. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 47, n. 1, p. 35, Fev, 1999.

GONDIM, L. F. P. et al. Um caso de neosporose canina no Município de Salvador, Bahia: Diagnóstico, isolamento e manutenção do agente. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 7, n. p. 102, 2000.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 159-161, Fev, 2004.

GUY, C. S. et al. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: Spontaneous transplacental infection is associated with an acute rise in maternal antibody. **Veterinary Record**, Londres, v. 149, n. 15, p. 443-449, Abr, 2001.

HÄSLER, B. et al. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 4, p. 222-230, Abr, 2006.

HEMPHILL, A. et al. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1175-1188, Ago, 1999.

HEMPHILL, A. et al. An European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 877-924, Jul, 2000.

HIETALA, S. K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, Out, 1999.

HOANE, J. S. et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 155-159, Mar, 2006.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 497-504, Nov, 2002.

JENKINS, M. C. et al. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 631-636, Maio, 2002.

MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal for Parasitology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 530-535, Ago, 1998.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, Set, 1998.

OOI, H. K. et al. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.90, n. 2, p.47-55, Jun, 2000.

PARÉ, J. et al. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 60, n. p. 133-139, 1996.

PESCADOR, C. A. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. p. 159-163, 2007.

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.

RAGOZO, A. M. A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. , p. 33-37, 2003.

SARTOR, I. F. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 413-418, 2005.

SCHARES, G. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, n. p. 87-98, 1998.

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. p. 29-33, 2005.

SPEER, C. A., DUBEY, J.P. Ultraestrutura de tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. **The Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 36, n. p. 458-463, 1989.

TREES, A. J., WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 558-561, Dez, 2005.

WOUDA, W. et al. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 7, p. 1311-1316, Maio, 1998.