

Devens, B.A. e Vilorio, M.I.V. Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta. PUBVET, V.2, N.10, Mar2, 2008.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v02n03a0168.1-7>

Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta

Bruna Alves Devens¹ e Marlene Isabel Vargas Vilorio²

¹Médica Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa/ Mestranda em Patologia Veterinária pela UFV. E-mail, brudevens@hotmail.com

²Médica Veterinária. Doutora em Patologia Geral pela UFMG – P.D.S pelo Instituto de Biomedicina Lopez-Neyra, Granada –Espanha.

RESUMO

A neosporose causada pelo protozoário apicomplexa, *Neospora caninum*, é considerada uma importante causa de aborto em bovinos, provocando falhas reprodutivas, além de provocar anormalidades neuromusculares em cães. Os hospedeiros definitivos são os cães e os coiotes por liberarem no ambiente as fezes contendo oocistos. Este trabalho visa à produção de antígenos para a preparação de lâminas a fim de realizar da imunofluorescência indireta, e assim a sua utilização na detecção de animais positivos em uma propriedade.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença Neosporose

A neosporose é causada por um parasita apicomplexa denominado de *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*, que são parasitas intracelulares obrigatórios, identificados, no passado, erroneamente como *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2002). As suas características taxonômicas são: filo:Apicomplexa, classe: Sporozoasida, sub-classe: Coccidiasina, ordem: Eucoccidiorida, família: Sarcocystidae, sub-família: Toxoplasmatina, gênero: *Neospora*, espécies: *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* (MARSH et al., 1998, JONES et al., 2000),

Constataram-se organismos semelhantes ao *Toxoplasma gondii* em cães da raça Boxer que apresentavam mieloencefalites, (BJERKAS, et al., 1984). Assim, em 1988, em um estudo retrospectivo com esses cérebros incluídos em parafina, Dubey identificou um novo gênero e espécie (DUBEY et al., 1996)

Os primeiros relatos de abortamento em bovinos relacionados ao *N. caninum* foram descritos, primeiramente, por Thilsted e Dubey em 1989, ao identificarem esses organismos em cérebro de fetos abortados em um rebanho leiteiro.

O *N. caninum* foi considerado a causa principal do abortamento em vacas leiteiras na Califórnia (Barr et al., 1991). Em 1991, Bjerkas e Dubey identificaram a mesma cepa em cães que possuíam o comprometimento do sistema nervoso central.

McAllister et al. em 1998 demonstraram que o cão era o hospedeiro definitivo fechando o ciclo biológico do parasita. Gondim et al. ,em 2004 reconheceram os coiotes como hospedeiros definitivos.

Devens, B.A. e Vilorio, M.I.V. Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta. PUBVET, V.2, N.10, Mar2, 2008.

O *N. caninum* pode ser encontrado em três diferentes estágios: os taquizoítos (forma livre), bradizoítos (cistos teciduais) e oocistos (nas fezes) (DUBEY e LINDSAY, 1996; DUBEY *et al.*, 2002).

1.2 Aspectos clínicos

Durante a gravidez de uma vaca o *N. caninum* invade as células do útero, provocando o aborto, caso isso não ocorra, haverá a persistência da infecção na mãe e no bezerro, podendo este apresentar ou não sinais clínicos. Enquanto no primeiro trimestre de gestação os fetos estão vulneráveis, no período médio gestacional existe um reconhecimento e resposta aos microorganismos, porém não o suficiente para evitar o aborto. Já no terceiro trimestre existe uma resposta competente ao patógeno, havendo a sobrevivência do feto (GONZÁLEZ *et al.*, 1999).

Uma resposta inflamatória observada pela invasão dos taquizoítos e sua multiplicação nos placentomas estimulam uma resposta imune inapropriada provocando o aborto. Há ocorrência de necrose em alguns focos que envolvem a micróglia, astrócitos, monócitos e séries linfóides, além da meningite e inflamação linfóide no coração, músculos esqueléticos, pulmão e fígado (OTTER, *et al.*, 1997).

Os cães com maior susceptibilidade ao *N. caninum* são labrador, boxer, golden retrievers, basset e, esses animais desenvolvem com o passar da idade os sinais clínicos. Sendo os casos mais severos: paresia e paralisia, dificuldade na deglutição, flacidez, hipotrofia muscular e falência cardíaca. Também é relatado o parasitismo nas células endoteliais vasculares, células dérmicas, e assim, reportando casos de neosporose cutânea (DUBEY *et al.*, 1988).

2. OBJETIVOS

Objetivou-se nesse trabalho a produção de antígenos do *N.caninum* (taquizoítos), a partir de uma amostra *Nc-beef*. Assim como a produção de lâminas para realização de um método de imunodiagnóstico ,imunofluorescência indireta, para detecção ,em soros, de anticorpos contra o *N. caninum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de células VERO (células do rim de macaco verde africano)

Realizou-se o cultivo de células VERO, a qual os procedimentos foram em capela de fluxo laminar, para evitar contaminações com fungos e bactérias do ambiente externo. As células foram mantidas em meio DMEM completo com 10% de soro fetal bovino, glutamina, antibiótico e antimicótico, em garrafas de poliestireno, e colocadas em estufas a 37º C a 5% de CO₂. por cerca de 48h.

3.2. Inoculação da monocamada

A monocamada das células quando alcançaram 80% de preenchimento foram inoculadas com o *N.caninum*, que estavam mantidas em nitrogênio líquido, a qual foi observado o efeito citopático do parasita.

3.3. Purificação dos antígenos

A mistura dos taquizoítos com as células foram centrifugadas a 1500g por dez minutos a 4º C, o pellet foi ressuspensão em PBS pH:7.2 e a suspensão foi transferida para um coluna cromatográfica.

3.4. Sensibilização das lâminas

Os taquizoítos foram contados em câmara de Neubauer e diluídos numa concentração de 300 taquizoítos por µl de PBS. As

Devens, B.A. e Vilorio, M.I.V. Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta. PUBVET, V.2, N.10, Mar2, 2008.

lâminas foram sensibilizadas com 15µl de suspensão de taquizoítos por pocinho e estocadas a -70° C.

3.5. Verificação da viabilidade das lâminas

À fim de verificar a viabilidade das lâminas realizou-se imunofluorescência indireta com soros confirmadamente negativos e positivos de ovinos, bovinos e cães.

4. CONCLUSÃO

Os antígenos produzidos e purificados mostraram-se em excelentes condições para a utilização em testes de diagnóstico, pela fluorescência observada nos taquizoítos fixados nas lâminas, que receberam soros positivos.

5. DISCUSSÃO

A neosporose é uma doença emergente que afeta animais em todo o mundo. Assim é necessário um diagnóstico preciso para comprovar ou descartar a presença do *N. caninum* no animal. Além da sua importância na adoção de medidas adequadas no controle e estabelecimento da epidemiologia da infecção (BOGER e HATTEL, 2003).

A imunofluorescência indireta foi o primeiro teste sorológico desenvolvido em 1988 por Dubey. É uma técnica mais comumente usada dos diagnósticos sorológicos, (DUBEY e LINDSAY, 1996).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Devens, B.A. e Vilorio, M.I.V. Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta. PUBVET, V.2, N.10, Mar2, 2008.

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

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

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

DUBEY, J.P., RIGOUTET, J., LAGOUETTE, P., GEORGE, C., LONGEART, L. LE NET, J.L. Fatal Transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*) from a zoo. **Journal of Parasitology**, v.82, p.338 - 339, 1996.

DUBEY, J.P. AND LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p1 - 59, 1996.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKAM, B.L.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, a; HILL, DE.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S., Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **Int.J.Parasitol.** v.32, p. 929-946, 2002.

Devens, B.A. e Vilorio, M.I.V. Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta. PUBVET, V.2, N.10, Mar2, 2008.

GONZALEZ, L.; BUXTON, D.; ATXAERANDIO, R.; ADURIZ, G.; MALEY, S.; MARCO J.C.; CUERVO, L.A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, London, v. 144, n.6, p. 145-150, 1999.

GONDIM, L.F.; MCALLISTER, M.M., PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.34, n.02, p.159-161, 2004.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W., **Patologia Veterinária**, 6ª ed., São Paulo, Editora Manole, 1416p., 2000.

MARSH, A. E.; BARR, B.C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDLHAUSEN, R.; CONRAD, P.A.; Neosporosis as a cause of equine Protozoal Myeloencephalitis. **J.Am.Vet. Med. Ass.** v.209, p. 1907-1913, 1996.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

OTTER, A J. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. **Veterinary Research**, Schaumburg, v.141, n.19, p.487- 489, 1997.

THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. Neosporosis – Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.205 – 209, 1989.