

ALESSANDRA SNAK

**EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM TAQUIZOÍTOS DA CEPA NC1
DE *Neospora caninum* EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE GESTAÇÃO EM
MATRIZES SUÍNAS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em
Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina
- UDESC, como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

LAGES - SC

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Snak, Alessandra
EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM
TAQUIZOÍTOS DA CEPÁ NC1 DE *Neospora caninum* EM
DIFERENTES ESTÁGIOS DE GESTAÇÃO EM MATRIZES
SUÍNAS / Alessandra Snak. -- 2020.
94 p.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

1. leitões. 2. neosporose. 3. marrãs. 4. mumificados. 5.
transmissão congênita. I. Barbosa de Moura, Anderson. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. III. Título.

ALESSANDRA SNAK

EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM TAQUIZOÍTOS DA CEPA NC1 DE *Neospora caninum* EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE GESTAÇÃO EM MATRIZES SUÍNAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: Anderson B. Moura
Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

Departamento de Medicina Veterinária-CAV/UDESC

Membro Interno: José Cristani
Prof. Dr. José Cristani

Departamento de Produção Animal e Alimentos-CAV/UDESC

Membro Interno: Andreas Lazaros Chrysafidis
Prof. Dr. Andreas Lazaros Chrysafidis

Departamento de Medicina Veterinária-CAV/UDESC

Membro Externo: Luiz Daniel Barros
Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – UEL

Membro Externo: Cristina Perito Cardoso
Dra. Cristina Perito Cardoso – CIDASC - Lages

Lages, 06 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço e peço desculpas aos animais, principalmente as 14 porcas, 140 leitões e os 3 cães utilizados nesse experimento. Espero, sinceramente, que esse estudo coopere para a ciência mundial e para a produção de suínos, para que as 140 eutanásias tenham valido a pena.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais (Terezinha e Delcio), avós (Tereza e José) e irmãs (Aline e Cristiane) por todo apoio e por permitirem eu chegar até essa etapa. Sem o incentivo de vocês não chegaria aqui. Line, obrigada por sempre estar do meu lado e por ajudar com as 500 extrações de DNA em um feriado estendido, Matheus, obrigada por sempre ajudar nas traduções.

Ao Ronaldo, por sempre estar do meu lado, me apoiar, ouvir meus desabafos, ajudar com o manejo das porcas nos fins de semana, levar almoço nos dias dos partos, todo o fim de semana me acompanhar até o CAV para cuidar do cultivo celular, e principalmente por tornar meus dias em Lages mais felizes e cheios de amor. Você foi a melhor coisa que me aconteceu em Lages.

Ao prof. Anderson por abrir as portas do CAV-UDESC para mim, por confiar no meu trabalho e me desafiar com esse projeto, aprendi muito, muito! Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou. Posso dizer, com certeza, que foi uma das fases da vida de maior aprendizado pessoal e profissional, e você foi responsável por isso. Obrigada por toda a ajuda, sempre! Sinto uma admiração gigantesca pelo profissional que tu és! Saio de Lages com o coração partido.

Ao prof. Zé Cristani por apoiar, aceitar fazer parte desse projeto, sanar várias das minhas dúvidas “burras” de manejo de suínos, ensinar manejo, reprodução, dar dicas e mais dicas e ajudar de todas as formas possíveis, inclusive de madrugada com leitões nascendo. Sem você não seria possível nada disso.

A prof. Mere, por também abraçar esse projeto e fornecer todo seu apoio com a patologia clínica. Aproveito, para agradecer a toda a equipe do laboratório de patologia clínica que ajudou de alguma forma.

Ao prof. Bira por permitir utilizar o CEDIMA para o cultivo celular e ajudar com várias dúvidas. Ainda, agradeço a Claudia, muito, muito obrigada pelo apoio e por toda a ajuda com os cultivos, lavagens de estufa e dicas sobre cultivo de células.

Agradeço ao Dorvalino, responsável pela limpeza e alimentação dos suínos, obrigada por sempre ajudar da melhor maneira possível, por ajudar com as detecções de cio, com as coletas de sêmen, com as inseminações. Obrigada por cuidar das minhas porquinhas!

Agradeço ao Carlos, por topar esse projeto juntamente comigo, por trabalhar muito e me ajudar de todas as formas possíveis. Você foi essencial! Não poderia deixar de agradecer pela sincera amizade.

Agradeço a todos os estagiários que ajudaram de forma impecável nesse projeto, sem vocês não conseguiria. Esse projeto é tanto meu quanto de vocês! Gilberto, Bia, Schay, Gilmar obrigada por acordar de madrugada quase todas as segundas e quartas para as coletas de sangue. Giulia e Gilberto obrigada por ficarem do meu lado nas noites em claro, quase congelando (ou congelando), aguardando o parto das porcas, obrigada por permitirem almoços com cheiro de porco, calça rasgada e fezes nas roupas na cantina do CAV, obrigada por ajudarem nas necropsias e ficarem mais de 24 horas no CAV acordados. Giulia e Ana obrigada por toda a ajuda com as extrações de DNA e PCR, sem vocês não teria conseguido! Dener, Gustavo e Gilmar obrigada por ajudarem com as rondas a noite pra verificar possíveis partos. Obrigada! Felipe, a você meu sincero agradecimento por passar tardes e mais tardes macerando órgãos dos leitões, obrigada por ajudar com os PCRs. Jéssica, obrigada por me ensinar tudo sobre o cultivo celular, lá no comecinho!

Ao Wagner, por todo apoio, por ajudar em todas as eutanásias e necropsias! Muito obrigada! Você foi essencial!

Agradeço ao Lain e a Joana pelas coletas de sêmen, ultrassom e por me socorrer com uma quase cesariana, mesmo já sendo noite.

Ao prof. Miletti e toda a equipe de alunos do laboratório de bioquímica onde foi possível realizar as extrações de DNA e PCR.

Agradeço a todas as amizades que fiz em Lages, por deixarem meus dias melhores e mais alegres, Giulia, Ana, Manu, Stefano, Carlos, Ricardo, Thais, Schay, Mariana. Já sinto falta de vocês.

Agradeço ao Centro de Controle de Zoonoses de Lages por realizar as castrações dos três cães de forma gratuita, permitindo assim, a possível doação dos animais. Agradeço, aos três tutores que adotaram os filhotes, para que pudessem ter um lar agradável e amável.

Agradeço, a Bia da UEL, por mesmo de longe, ajudar com dúvidas sobre cultivo celular e taquizoítos, esse cultivo deu trabalho, e você sempre estava disposta a ajudar.

Agradeço a Hilda e a Solange da USP, por todo o apoio com o cultivo celular.

A prof. Silvia, por ter indicado a UDESC e sugerido o prof. Anderson como orientador, com certeza, por sua causa cheguei até aqui! Obrigada!

Agradeço a todos os meus ex-alunos do CAV, que mesmo não possuindo um envolvimento direto com o projeto, tive a oportunidade de conhece-los e desenvolver a atividade de docência por conta do doutorado. Foi incrível esse período.

Agradeço a todos os professores do CAV que tive a oportunidade de conhecer, trocar conhecimentos e que ensinaram algo durante esse período.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a CAPES e a FAPESC pelas bolsas fornecidas durante todo esse período. Ainda, agradeço a FAPESC pelo financiamento e possibilidade de realizar esse projeto (Chamada pública 01/2016 – Termo de Outorga: 779/2017).

Meus sinceros agradecimentos!

*“E guardemos a certeza pelas próprias
dificuldades já superadas que não há mal
que dure para sempre.” (Chico Xavier)*

RESUMO

SNAK, A. **Efeitos da infecção experimental com taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora caninum* em diferentes estágios de gestação em matrizes suínas**, 2020. Tese, (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

Neospora caninum é um protozoário heteroxeno do Filo Apicomplexa, que infecta diversas espécies animais, tendo como principal hospedeiro definitivo o cão doméstico. Em bovinos é responsável por desordens reprodutivas e prejuízos econômicos. A Infecção natural em suínos já foi relatada no Brasil e em outros países, porém a patogenia e os sinais clínicos não estão completamente elucidados nesta espécie. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos decorrentes da infecção experimental com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* em matrizes suínas, em diferentes estágios da gestação, e verificar a possibilidade de transmissão transplacentária. Doze marrãs, da linhagem comercial Agrocere Pic Camborough, soronegativas para *Toxoplasma gondii* e *N. caninum* foram alocadas em quatro grupos de três animais cada. Os animais do grupo A não foram inoculados (controle) e os animais dos grupos B, C e D foram inoculados 30 dias antes da concepção, e aos 45 e 90 dias de gestação, respectivamente. O inóculo foi constituído de $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*, via intravenosa. Amostras de sangue, saliva e muco vaginal dos animais foram colhidas nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55, 70, 85, 100, 115, 130 (Dias Pós Inoculação) para realização de hemograma, análises bioquímicas, pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum* (RIFI) e de papa de leucócitos para a detecção da parasitemia (PCR). Exames clínicos dos animais (temperatura e frequência respiratória) foram realizados nos mesmos dias das coletas de amostras. Dos leitões nascidos hígidos (126), foram colhidos sangue e saliva (pré e pós colostrar). Após a eutanásia, foi realizada necropsia e amostras de tecidos dos animais (placenta, SNC, pulmão, fígado, coração e diafragma) foram colhidas para pesquisa do agente por meio da PCR. Todas as marrãs soroconverteram a partir do 5 e 7 DPI (dia pós inoculação) para IgM e IgG, respectivamente. Duas marrãs apresentaram hipotermia no 5 e 7 DPI e cinco animais inoculados apresentaram leucocitose no 7 DPI. Foi possível detectar o protozoário em amostras de saliva (33), muco vaginal (17) e sangue (2) das marrãs durante a gestação. As três fêmeas do grupo B apresentaram indícios, a partir da sorologia (IgM) e PCR, de reagudização da infecção durante a gestação. Nove das 12 fêmeas expulsaram 24 fetos mumificados no momento do parto, sendo duas do grupo A (oito), duas do grupo B (quatro), as três do grupo C (nove) e duas do grupo D (três). Dos 24 fetos mumificados, nove foram positivos no PCR para *N. caninum*, sendo um (25%) feto do grupo B, sete (77,8%) do grupo C, e um (33,3%) do grupo D. Quando analisados os órgãos dos leitões provenientes de fêmeas inoculadas, pela PCR, para detecção de *N. caninum*, verificou-se que 88 (93,61%) foram positivos. Todas as marrãs inoculadas deram origem a pelo menos um leitão positivo, demonstrando, que ocorre transmissão transplacentária em diferentes fases de gestação, independente do momento de infecção.

Palavras-chave: leitões, neosporose, marrãs, mumificados, transmissão congênita

ABSTRACT

SNAK, A. **Effects of experimental infection with *Neospora caninum* strain Nc1 tachyzoites at different stages of gestation in swine breeders**, 2020. Thesis, (Doctorate in Animal Science) - Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2020.

Neospora caninum is a heteroxen protozoan of the Apicomplexa Phylum, which infects several animal species, having as main definitive host the domestic dog. In cattle it is responsible for reproductive disorders and economic losses. Natural infection in pigs has been reported in Brazil and other countries, but the pathogenesis and clinical signs are not completely elucidated in this species. The aim of this study was to evaluate the effects of experimental infection with tachyzoites of *N. caninum* strain Nc1 in swine breeders at different stages of pregnancy, and to verify the possibility of transplacental transmission. Twelve gilts from the Agroceres Pic Camborough strain, seronegative to *Toxoplasma gondii* and *N. caninum* were allocated to four groups of three animals each. The animals of group A were not inoculated (control) and the animals of groups B, C and D were inoculated 30 days before conception, and at 45 and 90 days of gestation, respectively. The inoculum consisted of 2.9×10^7 tachyzoites of the *N. caninum* Nc1 strain intravenously. Blood, saliva and vaginal mucus samples were collected from days -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55, 70, 85, 100, 115, 130, 145 DPI (Days Post Inoculation) for blood count, biochemical analysis, screening for IgG and IgM antibodies against *N. caninum* (RIFI) and buffy coat for detection of parasitemia (PCR). Clinical examinations of animals (temperature and respiratory rate) were performed on the same days as sample collection. From healthy born piglets (126), blood and saliva (pre and post colostrum) were collected. After euthanasia, necropsy was performed and animal tissue samples (placenta, CNS, lung, liver, heart and diaphragm) were collected for PCR screening. All gilts seroconverted from 5 and 7 DPI (day post inoculation) to IgM and IgG, respectively. Two gilts presented hypothermia at 5 and 7 DPI and five inoculated animals presented leukocytosis at 7 DPI. It was possible to detect protozoan in saliva (33), vaginal mucus (17) and blood (2) samples from gilts during pregnancy. The three females from group B presented evidence, from serology (IgM) and PCR, of reacudization of infection during pregnancy. Nine of the 12 females expelled 24 mummified fetuses at birth, two from group A (eight), two from group B (four), three from group C (nine) and two from group D (three). Of the 24 mummified fetuses, nine were positive for *N. caninum* PCR, one (25%) from group B, seven (77.8%) from group C, and one (33.3%) from group D. When the organs of piglets from females inoculated by PCR were analyzed for detection of *N. caninum*, 88 (93.61%) were positive. All inoculated gilts gave birth to at least one positive piglet, demonstrating that there is transplacental transmission in different stages of pregnancy, regardless of the moment of infection.

Keywords: piglets, neosporosis, gilts, mummified, congenital transmission

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias, por grupo de animais, da temperatura retal e frequência respiratória em marrãs gestantes inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de <i>Neospora caninum</i>	43
Tabela 2 - Média, por grupo, das recíprocas de títulos de IgM e IgG contra <i>Neospora caninum</i> no soro e plasma de marrãs inoculadas com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1, do dia -2 ao dia 130 pós inoculação	46
Tabela 3 - Resultados da pesquisa de anticorpos IgG (RIFI) contra <i>N. caninum</i> no muco vaginal de marrãs inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1	47
Tabela 4- Resultado da PCR de <i>Neospora caninum</i> em saliva e muco vaginal de marrãs experimentalmente inoculadas com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1, do dia 2 ao dia 130 pós inoculação.....	49
Tabela 5 - Número, tamanho, estimativa da idade gestacional e resultados da pesquisa de DNA do parasito (PCR) nos tecidos de fetos mumificados provenientes de marrãs inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de <i>Neospora caninum</i>	65
Tabela 6 - Tamanho da leitegada (n), tamanho (cm), peso (g) e sexo dos leitões, peso (g) da placenta e estimativa do peso (g) da placenta dos leitões em fêmeas suínas inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de <i>Neospora caninum</i> ...	66
Tabela 7 - Detecção de anticorpos IgG contra <i>Neospora caninum</i> , no soro e plasma, ao nascimento (pré-colostral) e 24 horas após, em leitões descendentes de fêmeas suínas inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de <i>N. caninum</i> , correlacionando com a titulação de IgG contra <i>Neospora caninum</i> no leite materno no momento do parto.	68
Tabela 8 - Detecção de <i>Neospora caninum</i> em tecidos e fluidos de leitões descendentes de fêmeas suínas inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de <i>N. caninum</i>	70
Tabela 9 – Coeficiente Kappa para resultados de PCR obtidos de tecidos e fluidos de leitões descendentes de porcas inoculadas e não inoculadas com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de <i>Neospora caninum</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do <i>Neospora caninum</i> . A) Oocisto; seta vermelha: oocisto esporulado, contendo dois esporocistos; seta preta: oocisto não esporulado; B) Taquízoito; seta vermelha: taquízoito extracelular; seta preta: taquízoito intracelular; C) Cisto, contendo no seu interior os bradizoítos. 1000X	24
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Neospora caninum</i>	25
Figura 3- Médias de títulos de anticorpos IgG e IgM no soro e plasma de marrãs experimentalmente inoculadas com com $2,9 \times 10^7$ taquízoítos da cepa Nc1, do dia 2 ao dia 130 pós inoculação.....	45
Figura 4 - Desenho esquemático da mensuração do tamanho de leitões/fetos, sendo realizada através da medida da nuca até a inserção da cauda.....	60
Figura 5 - Fetos mumificados provenientes de marrãs inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquízoítos da cepa Nc1 de <i>Neospora caninum</i>	64
Figura 6 - Má formação fetal em leitões. A) epiteliogênese imperfeita no membro anterior; B) duplicação parcial na região facial.....	64

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. NEOSPORA CANINUM	23
2.2.1. HISTÓRICO	23
2.2.2. ESTRUTURA E CICLO	23
2.2.3. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	25
2.2.4. DIAGNÓSTICO	26
2.2.5. <i>Neospora caninum</i> EM SUÍNOS	27
2.2. REFERÊNCIAS.....	29
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. ARTIGO 1	37
4.1. RESUMO	37
4.2. INTRODUÇÃO	37
4.3. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.3.1. Comitê de Ética	38
4.3.2. Seleção das marrãs.....	38
4.3.3. Inoculação	39
4.3.4. Colheita de amostras.....	39
4.3.5. Análises.....	40
a) Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra <i>N. caninum</i>	40
b) Hemograma e análise bioquímica	41
c) Sinais clínicos.....	41
d) Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	41
4.3.6. Estatística.....	42
4.4. RESULTADOS.....	42
4.4.1. Temperatura e frequência respiratória	42
4.4.2. Hemograma, leucograma e análises bioquímicas	43
4.4.3. Sorologia	44
4.4.3.1. Soro.....	44
4.4.3.2. Plasma	44
4.4.3.3. Saliva e muco vaginal	47
4.4.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	48
4.4.5. Coeficiente de Concordância De Kappa.....	48
4.5. DISCUSSÃO.....	49
4.6. CONCLUSÃO	52
4.7. REFERÊNCIAS.....	53
5. ARTIGO 2	56
5.1. RESUMO	56
5.2. INTRODUÇÃO	57
5.3. MATERIAL E MÉTODOS	57

5.3.1. Comitê de Ética em Experimentação Animal	57
5.3.2. Seleção dos Animais	58
5.3.3. Inoculação	58
5.3.4. Pré-parto	59
5.3.5. Colheita de amostras.....	59
a) Marrãs	59
6. Leitões.....	59
6.1.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	60
6.1.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	61
6.1.3. Bioensaio em cães	61
6.1.4. Estatística.....	62
6.2. RESULTADOS.....	62
6.2.1. Marrãs	62
6.2.2. Leitões.....	63
6.2.2.1. Tamanho, peso e sexo.....	66
6.2.2.2. Sorologia.....	67
a) IgG.....	67
7. IgM	68
7.1.1. PCR para detecção de <i>N. caninum</i>	69
7.1.2. Coeficiente de concordância de Kappa	71
7.1.3. Bioensaio em cães	72
7.2. DISCUSSÃO	72
7.3. CONCLUSÃO	78
7.4. REFERENCIAS.....	78
8. ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Protozoário que infecta diversas espécies animais, *N. caninum* é conhecido por causar prejuízos, principalmente em bovinos. Os principais sinais clínicos estão relacionados com problemas reprodutivos, notadamente abortos e natimortos (CANTÓN et al., 2014; McALLISTER, 2016) em ruminantes e problemas neuromusculares em cães (McALLISTER, 2016).

O controle da doença é dificultado por ainda não haver tratamento eficaz e pela ocorrência de transmissão transplacentária, sendo essa a principal forma de manutenção do parasito em rebanhos bovinos. Além disso, a infecção por *N. caninum* pode ser persistente, ou seja, uma vez a fêmea infectada, ela poderá transmitir o parasito para a progênie em sucessivas gestações, sem necessariamente se infectar novamente (McALLISTER, 2016).

São raros os trabalhos de *N. caninum* em suínos, porém sabe-se que esse protozoário infecta essa espécie animal, pois estudos de prevalência foram desenvolvidos em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil (HELMICK et al., 2002; BARTOVA e SEDLAK, 2011; SHARMA et al., 2015; FEITOSA et al., 2014). O que ainda não está claro é a patogenia da doença, além dos sinais clínicos, e a possibilidade da transmissão transplacentária e suas consequências na espécie suína.

Os principais problemas em matrizes suínas são os de ordem reprodutiva, devido à redução do número de leitões/porca/ano, resultando em prejuízo econômico (BORTOLETTO et al., 2014). Diversos são os patógenos responsáveis por causar aborto em suínos, podendo ser vírus, bactérias (BORTOLETTO et al., 2014) ou protozoários como o *T. gondii* (BASSO et al., 2015).

É de suma importância o diagnóstico correto das causas de aborto para a adoção de tratamento, controle e prevenção adequados. Como a infecção natural por *N. caninum* ainda não foi correlacionada com desordens reprodutivas em suínos, a disseminação do parasito pode estar sendo facilitada devido à falta de medidas de controle e prevenção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Neospora caninum*

2.1.1 HISTÓRICO

O primeiro relato do *N. caninum* foi em 1984, quando Bjerkas et al. (1984). descreveram cistos teciduais no sistema nervoso central de cães, semelhantes a *T. gondii*. Porém, ele foi reconhecido como uma nova espécie em 1988 (DUBEY et al., 1988) e, desde então, vários trabalhos vêm sendo realizados para conhecer a epidemiologia e patogenia da doença em diversas espécies animais, incluindo silvestres (DANAHOE et al., 2015).

Após a descrição do *N. caninum* em cães, ele foi encontrado em bovinos em 1989 (LINDSAY e DUBEY, 1989) e associado com surtos de abortamentos no mesmo ano (THILSTED e DUBEY; 1989). Em seguida foi comprovada a transmissão vertical do protozoário em bovinos (DUBEY et al., 1992a).

Já em caprinos, ovinos, equinos, felinos e primatas a primeira descrição do protozoário foi em 1992, 1990, 1985, 1989, 1994, respectivamente (BARR et al., 1992; DUBEY et al., 1992b; BARR et al., 1994; DUBEY e LINDSAY, 1989a; DUBEY e LINDSAY, 1989b; DUBEY e PORTERFIELD, 1990; DUBEY et al., 1990).

Em suínos, a primeira infecção experimental foi realizada por Dubey et al. (1996), onde os animais infectados soroconverteram duas semanas após a infecção. Em seguida, Jensen et al. (1998) verificaram a transmissão transplacentária através da inoculação da cepa NC-SweB1, via intramuscular.

O hospedeiro definitivo do *N. caninum* só foi identificado em 1998, em um experimento em que os cães eliminaram oocistos do protozoário, após ingerirem tecidos contendo bradizoítos (McALLISTER et al., 1998). Já o ciclo do parasito só foi confirmado quando Dijkstra et al. (2001) demonstraram que os cães eliminavam oocistos do protozoário após ingerirem placenta de vacas soropositivas, antes disso, Marez et al. (1999) comprovaram a transmissão horizontal, quando demonstraram que bovinos podem se infectar ingerindo oocistos de *N. caninum*.

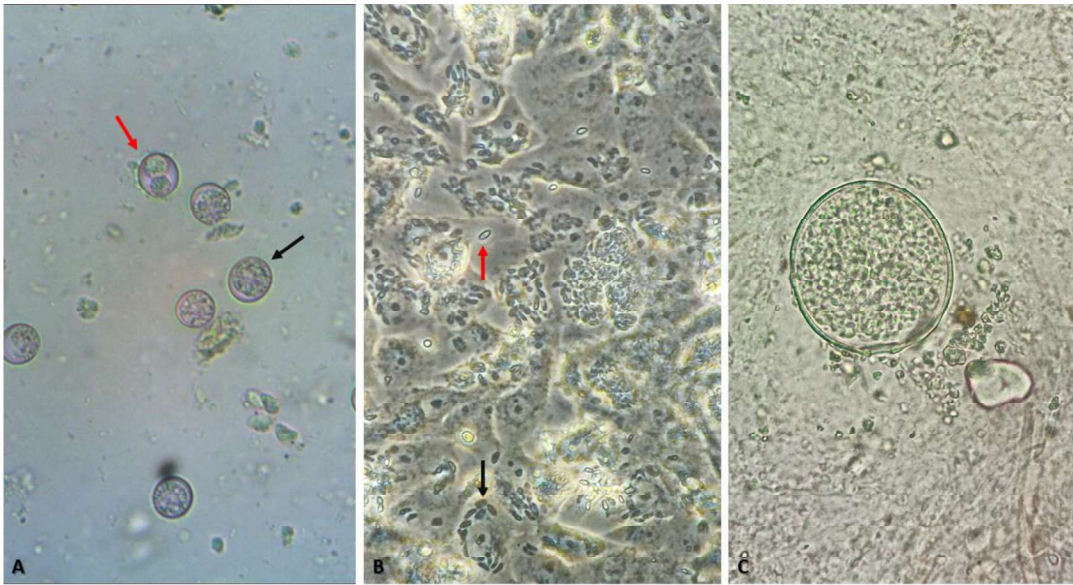
2.1.2 ESTRUTURA E CICLO

N. caninum é um protozoário heteroxeno do Filo Apicomplexa. Os hospedeiros definitivos comprovados até o momento são o cão, o coiote, o dingo e o lobo cinzento (DUBEY e SCHARES, 2011; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; McALLISTER et al.,

1998). Já os hospedeiros intermediários podem ser animais de diversas espécies, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos, aves, além dos próprios cães e animais silvestres (DUBEY e SCHARES, 2011; GOODSWEN et al., 2013).

O *N. caninum* possui três estruturas no ciclo de vida, todas com potencial de infecção: os esporozoítos, os taquizoítos e os bradizoítos (Figura 1) (GOODSWEN et al., 2013; DONAHOE et al., 2015).

Figura 1 - Formas evolutivas do *Neospora caninum*. A) Oocisto; seta vermelha: oocisto esporulado, contendo dois esporocistos; seta preta: oocisto não esporulado; B) Taquízoito; seta vermelha: taquízoito extracelular; seta preta: taquízoito intracelular; C) Cisto, contendo no seu interior os bradizoítos. 1000X



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

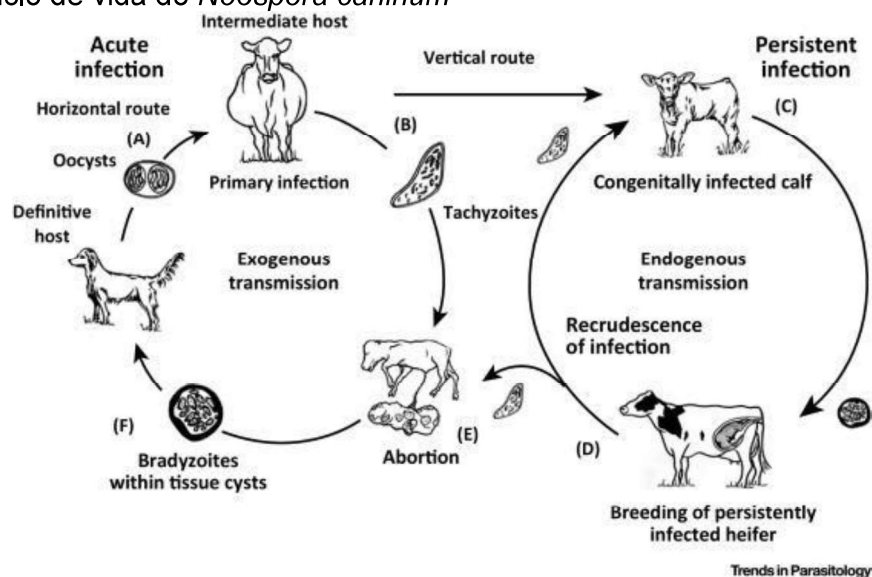
Os hospedeiros definitivos se infectam quando ingerem tecidos (principalmente sistema nervoso central, coração, fígado, placenta e musculatura) do hospedeiro intermediário contendo os bradizoítos do *N. caninum*. Os bradizoítos possuem cerca de 6-8 x 1-1,8µm de tamanho, se multiplicam por endodiogenia e estão envoltos por um cisto circular com até 107µm de diâmetro (MONNEY e HEMPHILL, 2014; MCALLISTER, 2016). Após a ingestão e digestão do cisto, os bradizoítos liberados infectam células epiteliais do intestino, onde haverá a reprodução sexuada e a formação de oocistos não esporulados, que são eliminados nas fezes (MONNEY e HEMPHILL, 2014).

Os oocistos medem cerca de 11,7 x 11,3µm e só se tornam infectantes após esporulação, que acontece quando há temperatura, umidade e oxigenação adequada no ambiente. Após esporulado, o oocisto possui dois esporocistos e oito esporozoítos (quatro em cada esporocisto) (DUBEY et al., 2007). Os hospedeiros intermediários se infectam quando ingerem oocistos esporulados (GOODSWEN et al., 2013).

Após ingestão, as paredes do oocisto e dos esporocistos se rompem e liberam os esporozoítos no trato gastrointestinal, esses invadem células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, transformam-se em taquizoítos e multiplicam-se através de endodiogenia. Os taquizoítos medem cerca de 3-7 x 1-5µm e atingem diversos órgãos pela corrente circulatória (GOODSWEN et al., 2013). Após várias multiplicações, em animais imunocompetentes, os taquizoítos se transformam em bradizoítos e encistam, permanecendo na forma crônica no hospedeiro (GOODSWEN et al., 2013; MONNEY e HEMPHILL, 2014).

Além da transmissão horizontal, o *N. caninum* pode ser transmitido verticalmente, quando a mãe infectada transmite o protozoário para o feto. Em bovinos, essa transmissão pode ocorrer de duas maneiras: endógena ou exógena. A primeira acontece devido à reativação e reconversão de bradizoítos em taquizoítos durante a gestação, esses atingindo o feto posteriormente. Já a forma exógena acontece quando o hospedeiro se infecta durante a gestação, então os taquizoítos migram para diversos órgãos, inclusive a placenta, atingindo o feto (Figura 2) (MCALLISTER, 2016).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Neospora caninum*



Fonte: GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I.; MILNE, E.; INNES, E. A. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

2.1.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A patogenicidade do *N. caninum* varia entre as espécies, assim como os sinais clínicos. A principal lesão causada pela infecção do *N. caninum* é a necrose, resultante da morte celular causada pela replicação intracelular dos taquizoítos. Nos hospedeiros intermediários essa lesão pode levar a doença neuromuscular, devido a destruição de

células neurais (DUBEY e LUHUNTA, 1993; DUBEY e LINDSAY, 1996; BUXTON et al., 2002).

São raros os sinais clínicos nos hospedeiros definitivos, e geralmente estão associados com diarreia autolimitante, no momento da eliminação dos oocistos através das fezes. Quando os canídeos atuam como hospedeiros intermediários podem apresentar sinais neurológicos, miocardite, dermatite e pneumonia (RUEHLMANN et al., 1995; LINDSAY et al., 1999; DONAHOE et al., 2015).

Já nos demais hospedeiros intermediários, o principal sinal clínico associado com a neosporose é o aborto, podendo ocorrer em sucessivas gestações. Caso não ocorra o aborto, podem nascer filhotes congenitamente infectados não apresentando sinais clínicos, ou podem nascer filhotes fracos, com baixo peso e sinais neurológicos. Um dos principais motivos que desencadeia o aborto é a necrose do sistema nervoso central e do coração do feto, gerada pela replicação dos taquizoítos. O aborto pode ainda estar associado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a resposta imune tipo Th1 na interface materno-fetal (CANTÓN et al., 2014; MCALLISTER, 2016). Além de abortos, morte e reabsorção embrionária (com posterior retorno ao cio) também têm sido associadas com a infecção por *N. caninum* em ruminantes (DUBEY, 1999; CANTÓN et al., 2014; MCALLISTER, 2016).

2.1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do *N. caninum* pode ser realizado por meio de exames diretos ou indiretos, sempre associado com histórico do animal ou do grupo de animais (DUBEY e SCHARES, 2006; ORTEGA-MORA et al., 2006; GUIDO et al., 2016).

Como métodos sorológicos podem ser realizados a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), o Teste de Aglutinação do *Neospora* (NAT), o *Immunoblotting*, o Teste de Imunocromatografia Rápida (RIT) e o Teste de Aglutinação em Latex (LAT). Os métodos sorológicos são utilizados principalmente para a investigação da doença, em estudos epidemiológicos ou como método de triagem e rastreamento da infecção na propriedade. Dentre os citados, os mais utilizados são a RIFI e o ELISA para o diagnóstico do protozoário (DUBEY e SCHARES, 2006; GUIDO et al., 2016).

Além dos métodos sorológicos, o diagnóstico pode ser através de métodos moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que possui alta sensibilidade e especificidade. A PCR é bastante utilizada para diagnóstico em casos de aborto, onde o tecido fetal, como cérebro, é utilizado para realizar a técnica. Pode também

ser utilizado sangue, onde será detectado DNA do parasito caso o animal apresente parasitemia (MULLER et al., 1996; DUBEY e SCHARES, 2006).

Outro exame direto é o método de histopatologia, que permite avaliar a extensão e a severidade das lesões nos fetos e não somente a infecção fetal, pois somente a presença do parasito não o confirma como causa do aborto (JENKINS et al., 2002). As principais lesões encontradas em fetos estão associadas com necrose e inflamação (GIBNEY et al., 2008; REITT et al., 2007; REGIDOR-CERRILLO et al., 2008). Associada com a histopatologia pode ser utilizada a imunohistoquímica, que facilita a visualização do antígeno (ORTEGA-MORA et al., 2006; MCALLISTER, 2016).

Ainda, o diagnóstico do *N. caninum* pode ser realizado através do isolamento, utilizando cultivo celular ou inoculação em animais de laboratório (gerbils). A vantagem dessa técnica é que permite uma avaliação da viabilidade do parasito e não só a presença dele no animal (DUBEY, 2003).

2.1.5 *Neospora caninum* EM SUÍNOS

O primeiro relato de inoculação de *N. caninum* em suínos foi em 1996, quando Dubey et al. inocularam $2,5 \times 10^6$ taquizoítos (cepa Nc1) via intramuscular, com o objetivo de testar os métodos de Imunofluorescência Indireta e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático para o diagnóstico do protozoário. Como resultado, os animais soroconverteram após duas semanas da inoculação.

Em seguida, Jensen et al. (1998) inocularam, via intramuscular, seis marrãs com taquizoítos da cepa NC-SweB1 de *N. caninum* com objetivo de verificar a transmissão transplacentária do parasito, porém os autores eutanasiaram as marrãs logo após a inoculação, não esperando, portanto, o fim da gestação. Todas as marrãs soroconverteram e foi possível detectar o protozoário em dois fetos, sendo esse um indicativo da transmissão transplacentária. Foram encontradas lesões de necrose e inflamação em diversos órgãos como fígado, coração, útero e pulmão dos fetos e das marrãs.

São poucos os trabalhos realizados com o objetivo de verificar a infecção do *N. caninum* em suínos. Trabalhos de ocorrência foram realizados em diversos países (HELMICK et al., 2002; BARTOVA e SEDLAK et al., 2011; SHARMA et al., 2015; FEITOSA et al., 2014; GUI et al., 2019; MINETTO et al., 2019).

Na Inglaterra, Helmick et al. (2002) analisaram soros de 454 fêmeas suínas com histórico de aborto ou consideradas inférteis e encontraram, através do ELISA, 8,8% das amostras positivas, porém quando analisadas através da RIFI (considerada como prova

padrão) todas foram negativas. Bartova e Sedlak (2011), na República Checa, analisaram 551 amostras de soro de suínos, coletadas em abatedouro, e 3% dos animais apresentaram anticorpos contra o *N. caninum* através da técnica de ELISA. Já Sharma et al. (2015) coletaram 185 amostras de soro de suínos, em Grenada, e todas foram negativas (ELISA) para o protozoário. Na Alemanha, em um estudo realizado em 2004, foram coletadas amostras de 2041 suínos provenientes de 94 propriedades, 3,3% dos animais foram positivos e 27,7% das propriedades possuíam pelo menos um animal positivo, pela técnica de ELISA, porém quando essas amostras foram testadas pela técnica de *Immunoblotting*, apenas uma apresentou resultado positivo (DAMRIYASA et al., 2004). A primeira descrição do protozoário em suínos na china foi em 2019, quando Gui et al. (2019) analisaram 1500 amostras de soro através da técnica de ELISA e 1,9% foram positivas.

No Brasil, há relatos da infecção por *N. caninum* em suínos domésticos no Estado da Paraíba. Azevedo et al. (2010) e Feitosa et al. (2014) analisaram amostras de soro através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (ponto de corte 1:50), de 130 e 190 suínos provenientes de abatedouros e encontram um percentual de 3,1 e 3,2 de amostras positivas, respectivamente. Já no Estado do Mato Grosso, Minetto et al. (2019) analisaram, por meio da RIFI, o soro de 1070 suínos criados em fundo de quintal e encontraram 13,49% de positividade. No Estado de Santa Catarina, foi verificada ocorrência de 18,9% (94/498) em matrizes de rebanhos comerciais (SILVA et al., 2020).

Quando analisadas amostras de suínos selvagens (*Sus scrofa*), a ocorrência do *N. caninum* é maior se comparada com os suínos domésticos. Nos Estados Unidos, Cerqueira-Cezar et al. (2016) analisaram amostras de 1059 suínos selvagens provenientes de 29 Estados, 15% das amostras foram positivas para o protozoário e 72,4% dos Estados possuíam pelo menos um animal positivo. Já no Brasil, Soares et al. (2016) analisaram amostras de 83 porcos-monteiro da região do Pantanal, MS, e encontraram 10,8% das amostras positivas. A maior ocorrência do protozoário em suínos selvagens pode estar relacionada com o contato destes com os hospedeiros definitivos e/ou outros hospedeiros intermediários, que é mais provável de ocorrer do que em suínos domésticos, criados confinados (SOARES et al., 2016).

Já Kamga-Waladjo et al. (2009) analisaram 60 amostras de soro de fêmeas de suínos errantes na região do Senegal e encontraram 58,3% das amostras positivas para *N. caninum*. Ainda, nesse estudo foi possível relacionar a positividade dos animais com os transtornos reprodutivos: o número anual de partos, de natimortos e a idade da porca foram associados ($p < 0,05$) com a soropositividade para *N. caninum*. Porém, Feitosa et al. (2014),

após analisarem 190 amostras de soro de suínos, não encontraram diferença significativa entre os animais com e sem histórico de aborto.

3 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J.; ALVES, C. J.; GUIMARAES FILHO, A. A. M.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SHARES, G.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 80-84, 2010.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; WOODS, L. W.; DUBEY, J. P.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 365-367, 1992.

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

BARTOVA, E.; SEDLAK, K. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic. **Parasitology**, v. 138, p. 1369-1371, 2011.

BASSO, W.; HANDKE, M.; SYDLER, T.; BOREL, N.; GRIMM, F.; SIDLER, X.; DEPLAZES, P. Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. **Parasitology International**, v. 64, p. 157-160, 2015.

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

BORTOLETTO, C.; FERREIRA, G. F.; GASSER, B.; NAKAMURA, A. M.; ALMEIDA, H. M. S.; OLIVEIRA, L. G. Main causes of reproduction disorders in sows. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Ano xii, n. 23, 2014.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

CANTÓN, G. J.; KATZER, F.; MALEY, S. W.; BARTLEY, P. M.; BENAVIDESSILVÁN, J.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PANG, Y.; SMITH, S. H.; ROCCHI, M. S.; BUXTON, D.; INNES, E. A.; CHIANINI, F. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. **Veterinary research**, v. 45, p. 11, 2014.

CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; PEDERSEN, K.; CALERO-BERNAL, R.; KWOK, O. C.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 35-37, 2016.

DAMRIYASA, I. M.; BAUER, C.; EDELHOFER, R.; FAILING, K.; LIND, P.; PETERSEN, E.; SCHARES, G.; TENTER, A. M.; VOLMER, R.; ZAHNER, H. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 271-286, 2004.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy hers. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 209-215, 2001.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; SLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International journal for parasitology**, v. 4, p. 216-238, 2015.

DUBEY J. P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 8, n. 4, p. 349-367, 1999.

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

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

DUBEY, J. P.; ACLAND, H. M.; HAMIR, A. N. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stiUborn goat. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 532-534, 1992b.

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

DUBEY, J. P.; HARTLEY, W. J.; LIUDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 127-130, 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 1-57, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 765-771, 1989a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Veterinary Medical Association**, v. 57, n. 3, p. 329-336, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992a.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 148-151, 1989b.

DUBEY, J. P.; LUHUNTA, A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. **Applied Parasitology**, v. 34, p. 229-233, 1993.

DUBEY, J. P.; PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 732-734, 1990.

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

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

FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; MELO, L. R. B.; ALMEIDA NETO, J. L.; SOUTO, D. V. O.; MORAIS, D. F.; ATHAYDE, A. C. R.; AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 305-309, 2014.

GIBNEY, E. H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A.; GUY, C. S.; SMITH, R. F.; HETZEL, U.; TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *N. caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 579-588, 2008.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMPLICKA, D. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133–150, 2013.

GUI, B. Z.; LY, Q. Y.; GE, M.; LI, R. C.; ZHU, X. Q.; LEI, G. H. First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. **Transbound Emerg. Dis.**, doi: 10.1111 / tbed.13358.

GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I.; MILNE, E.; INNES, E. A. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 131-143, 2016.

HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRU, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 187-189, 2002.

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

JENSEN, L.; JENSEN, T. K.; LIND, P.; HENRIKSEN, S. A.; UGGLA, A.; BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 475-482, 1998.

KAMGA-WALADJO, A. R.; CHATAGNON, G.; BAKOU, S. N.; BOLY, H.; DIOP, P. E. H.; TAINURIER, D. *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive characteristics in wandering sows from Senegal, West Africa. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 4, n. 5, p. 263-266, 2009.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int Journal of Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LINDSAY, D. S. & DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

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.

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

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.

MINETTO, M. K.; WITTER, R.; OLIVEIRA, A. C. S.; MINETTO, J. A.; BARROS, M. L.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Antibodies anti-Toxoplasma gondii and Neospora caninum in backyard pigs from the state of Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, pp. 403-409, 2019.

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 52-70, 2014.

MULLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2850–2852, 1996.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 1, p. 1-14, 2006.

REGIDOR-CERRILLO, J.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; PEREIRA-BUENO, J.; ADURIZ, G.; NAVARRO-LOZANO, V.; RISCO-CASTILLHO, V.; FERNANDEZ-GARCIA, A.; PEDRAZA-DIAZ, S.; ORTEGA-MORA, L. M. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. **Parasitology**, v. 135, p. 1651-1659, 2008.

REITT, K.; HILBE, M.; VOEGTLIN, A.; BORBOZ, L.; HAESSING, M.; POSPISCHIL, A. Aetiology of Bovine Abortion in Switzerland from 1986 to 1995 – A retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, p 15-22, 2007.

RUEHLMANN, D.; PODELL, M.; OGLESBEE, M.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis: A case report and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, p.174-183, 1995.

SHARMA, R. N.; TIWARI, K.; CHIKWETO, A.; DEALLIE, C.; BHAIYAT, M. I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in pigs in Grenada, West Indies. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 5, n. 138-141, 2015.

SILVA, M. O.; SNAK, A.; REITER J. C.; SERIGHELLI JUNIOR, G.; CRISTANI, J.; MOURA, A. B. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and factors associated with infection in commercial herds in two regions of the state of Santa Catarina, Brazil. **Semina**, v. 41, n.2, p. 697-702.

SOARES, H. S.; RAMOS, V. N.; OSAVA, C. F.; OLIVEIRA, S.; SZABÓ, M. P. J.; PIOVEZAN, U.; CASTRO, B. B.; GENNARI, S. M. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wild pigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 112-116, 2016.

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.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da infecção experimental com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* em diferentes estágios de gestação de matrizes suínas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as respostas imunológica, hematológica e clínica da infecção por *N. caninum* em diferentes estágios de gestação de matrizes suínas.

Verificar se ocorre e em qual a fase da gestação é mais frequente a transmissão transplacentária de *N. caninum* em suínos.

Averiguar se o protozoário *N. caninum* causa dano à progênie de matrizes suínas experimentalmente infectadas.

Pesquisar a presença do *N. caninum* em órgãos de leitões recém-nascidos, descendentes de fêmeas infectadas experimentalmente com o agente.

5 ARTIGO 1

Infecção experimental de taquizoítos da cepa NC1 de *Neospora caninum* em fêmeas suínas

5.1 RESUMO

Neospora caninum é um protozoário que afeta diversas espécies animais, causando problemas reprodutivos, porém em suínos a patogenia e os sinais clínicos não são totalmente conhecidos, embora já relatada a infecção por *N. caninum* nesta espécie. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da infecção experimental com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* em matrizes suínas em diferentes estágios de gestação. Para isso foram selecionadas 12 marrãs, soronegativas para *N. caninum* e *T. gondii*, e alocadas em quatro grupos de três animais cada. Os animais do grupo A não foram inoculados (controle) e os animais dos grupos B, C e D foram inoculados 30 dias antes da concepção, e aos 45 e 90 dias de gestação, respectivamente. O inóculo foi constituído de $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*, via intravenosa. Temperatura, frequência cardíaca, amostras de sangue, de saliva e de muco vaginal dos animais foram colhidas periodicamente até o momento do parto para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum* (RIFI) e PCR para detecção do parasito. Todas as marrãs soroconverteram a partir do 5 e 7 DPI (dia pós inoculação) para IgM e IgG, respectivamente. Duas marrãs apresentaram hipotermia no 5 e 7 DPI e cinco animais inoculados apresentaram leucocitose no 7 DPI. Foi possível detectar o protozoário em amostras de saliva (33), muco vaginal (17) e sangue (2). Os três animais do grupo B apresentaram indícios, a partir da sorologia (IgM) e PCR, de reagudização da infecção durante a gestação. Conclui-se que o protozoário pode causar sinais clínicos em fêmeas suínas infectadas, além de indicar a saliva como um material biológico adequado para a pesquisa do antígeno nessa espécie animal.

Palavras-chave: neosporose, suinocultura, marrãs, inoculação

5.2 INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário heteroxeno do Filo Apicomplexa. Parasita diversas espécies de animais, tendo como hospedeiros definitivos canídeos. Esses, após ingerirem tecido animal com bradizoítos, eliminam oocistos nas fezes, contaminando o meio ambiente, alimentos e água que serão fornecidos para outros animais (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).

Os herbívoros são os principais hospedeiros intermediários e, dentre eles, a espécie que possui maior importância e, conseqüentemente, mais estudos, é a bovina, devido aos grandes prejuízos na produção causada pelas falhas reprodutivas (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).

Em suínos, são raros os estudos da infecção por *N. caninum*. O primeiro trabalho envolvendo essa espécie animal foi desenvolvido por Dubey et al. (1996) que inocularam dois suínos com $2,5 \times 10^6$ taquizoítos (cepa Nc1) com o objetivo de testar os métodos de ELISA e RIFI. Como resultado os dois animais soroconverteram duas semanas após a inoculação. Já em 1998, Jensen et al. inocularam seis marrãs com $2,5 \times 10^6$ taquizoítos da cepa NC-SweB1 de *N. caninum* com objetivo de verificar a transmissão transplacentária do parasito. Todas as marrãs soroconverteram e foi possível detectar o protozoário em dois fetos, sendo esse um indicativo da transmissão transplacentária.

Contudo, até o momento não há estudos para verificar as alterações que o *N. caninum* podem causar em fêmeas suínas gestantes e recém infectadas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da infecção experimental com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* em diferentes estágios de gestação de matrizes suínas, avaliando as respostas imunológica, hematológica e clínica da infecção, além de verificar quais amostras (saliva, muco vaginal, sangue) apresentam melhores resultados para a detecção do protozoário.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CAV/UDESC, sendo aprovado sob protocolo número 7997170717.

5.3.2 Seleção das marrãs

Foram selecionadas 12 marrãs, com 10 meses de idade e aproximadamente 130kg, híginas, da linhagem comercial Agroceres Pic Camborough soronegativas (RIFI) para *T. gondii* e *N. caninum*.

Os animais foram mantidos em baias individuais, no setor de suinocultura, do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), onde receberam alimentação e manejo de rotina. Todas elas foram fertilizadas através de inseminação artificial intrauterina, sendo o cio detectado por contato direto,

diariamente, com um macho hígido. O macho doador de sêmen apresentava histórico reprodutivo previamente conhecido, além de ser negativo sorologicamente para *T. gondii* e *N. caninum*.

A gestação foi confirmada com o uso da ultrassonografia transabdominal, sendo essa realizada aos 45 dias e aos 90 dias de gestação, para avaliar a manutenção da gestação e a viabilidade fetal.

5.3.3 Inoculação

As marrãs foram separadas em quatro grupos de três animais cada. Os animais do grupo A foram mantidos como controle, não inoculados. Os animais dos grupos B, C e D foram inoculados, via intravenosa, 30 dias antes da concepção e aos 45 e 90 dias de gestação, respectivamente.

Para a inoculação foram utilizados $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* obtidos através de cultivo celular com células VERO, enriquecidas diariamente com meio RPMI e soro fetal bovino (10%), conforme descrito por Williams et al. (1997).

No período pós inseminação até o dia 110 de gestação as marrãs foram mantidas em baias individuais e observadas três vezes por dia, para detecção de possível aborto ou alterações clínicas.

5.3.4 Colheita de amostras

Amostras de sangue dos animais foram colhidas periodicamente desde dois dias antes da inoculação até o parto, portanto os animais do grupo B foram coletadas amostras nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55, 70, 85, 100, 115, 130 DPI (Dias Pós Inoculação), do grupo C nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55 DPI, e do grupo D -2, 2, 5, 7, 14, 21 DPI, já dos animais do grupo A (controle) foram colhidas amostras nos mesmos dias dos animais do grupo C.

Das amostras de sangue foram realizados hemograma, análises bioquímicas (AST e GGT), obtenção de soro e plasma (pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum*, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta-RIFI) e de papa de leucócitos (detecção da parasitemia por meio da PCR). Exames clínicos dos animais (temperatura e frequência respiratória) foram realizados nos mesmos dias das coletas de amostras biológicas.

Nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55, 70, 85, 100, 115, 130 DPI, foram também colhidas amostras de saliva e de muco vaginal para a pesquisa de anticorpos contra *N.*

caninum (IgG e IgM, RIFI) e para a detecção do agente (PCR). Para a coleta foram utilizados *swabs*, sendo esses colocados em tubos cônicos contendo 200µl de PBS, mantidos em repouso por uma hora e então centrifugados a 1700g por 3 min e as amostras assim obtidas foram armazenadas (-20°C) até processamento.

5.3.5 Análises

a) Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum*

As lâminas utilizadas para RIFI foram adsorvidas com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*. Para isso, foram utilizados taquizoítos provenientes do cultivo celular. Esses foram lavados com PBS pH 7,2 (1,368M NaCl, 0,0268M KCl, 0,1014M Na₂HPO₄, 0,0176M KH₂PO₄) sucessivas vezes para retirar o máximo de sujidades (resto celular) e de meio de cultura e então foram depositadas em lâminas demarcadas com adesivo teflon (12 poços). As lâminas foram secas em temperatura ambiente, fixadas com metanol e armazenadas em freezer a -20°C até a utilização.

Foi realizada RIFI para pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum* em todas as amostras de soro, plasma, saliva e muco vaginal. O ponto de corte utilizado foi a diluição 1:50 (AZEVEDO et al., 2010).

As amostras de saliva e muco vaginal foram avaliadas pela RIFI (IgG e IgM) sem diluição, inicialmente. As amostras positivas foram então diluídas com PBS na razão 2 (1:25, 1:50, 1:100...).

As amostras de soro e de plasma foram diluídas com PBS em série de razão dois (1:50, 1:100, 1:200, 1:400...), em seguida 12µL de cada diluição foram adicionados em cada poço da lâmina de imunofluorescência e incubada por 40min a 37°C. Após, foram realizadas três lavagens com PBS. A lâmina foi seca em estufa a 37°C e então foram adicionados 12µL do conjugado anti-IgG (Sigma®) ou anti-IgM (Bethyl®) suíno diluído com PBS conforme recomendação, e incubado durante 40min a 37°C. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS e a lâmina foi seca em estufa a 37°C. Após, duas gotas de glicerina tamponada foram acrescidas e então a lâmina foi coberta com lamínula. Na sequência, foi realizada a leitura conforme descrito por Paré et al. (1995) em microscópio de epifluorescência em um aumento de 400 vezes.

b) Hemograma e análise bioquímica

Foi realizado hemograma completo de todas as amostras de sangue coletadas das marrãs, com auxílio do aparelho hematológico SDH-3 VET®, e confirmação do diferencial de leucócitos através de leitura de esfregaço sanguíneo. Além de análises bioquímicas, para a mensuração de AST e GGT, utilizando o analisador automático LABMAX PLENNO®.

c) Sinais clínicos

Foram realizados exames clínicos das marrãs (temperatura retal e frequência respiratória) nos mesmos dias das coletas de sangue. Esses dados foram tabulados e analisados para verificar possíveis alterações decorrentes da fase aguda da infecção nos animais ou reagudização durante a gestação.

d) Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A técnica da PCR foi empregada para detectar o agente no sangue (parasitemia), saliva e muco vaginal das marrãs inoculadas.

A extração de DNA da capa leucocitária, saliva e muco vaginal das marrãs foi realizada conforme descrito por Cavalcante (2010).

Para a PCR, a região Nc5 (5,10) foi selecionada como sequência alvo para a amplificação de DNA. Para isso foram utilizados os *primers* Np21/Np6 (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTA-3')/(5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') (MULLER et al., 1996).

A reação foi realizada com um volume final de 50µL, contendo tampão 10X, 200µM DNTP, 1,5mM MgCl₂, 20µM de cada primer, 1,25U Taq, com desnaturação inicial a 95°C-5min, 40 ciclos a 94°C-1min/63°C-1min/74°C-3,5min e extensão final a 74°C-10min. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%) para visualização. O controle positivo foi composto por DNA extraído de taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*, e como controle negativo foi utilizada água ultrapura autoclavada.

5.3.6 Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os animais divididos em quatro grupos com três repetições.

Para verificar a concordância entre os testes empregados em diversos tecidos e fluidos foi utilizado o Coeficiente de Concordância de Kappa (intervalo de confiança: 95%), considerado concordância insignificante valores abaixo de zero, fraca entre 0 e 0,2, razoável entre 0,21 e 0,4, moderada entre 0,41 e 0,6, forte entre 0,61 e 0,8 e quase perfeita entre 0,81 e 1 (LANDIS e KOCK, 1977).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Temperatura e frequência respiratória

Os dados das médias de temperatura corporal e de frequência respiratória dos animais estão apresentados na tabela 1 e, de forma geral, estão dentro da normalidade para a espécie. Com relação a temperatura, os animais do grupo B apresentaram hipertermia no início (2 DPI) e menor temperatura corporal na fase final do experimento (100, 115, 130). Dois animais, um do grupo C e outro do grupo D, apresentaram temperaturas abaixo de 36°C, nos 7 (35,3°C) e 5 (35,8°C) DPI, respectivamente (Tabela 1). Já com relação à frequência respiratória (FR), somente animais do grupo B, no dia -2 DPI, apresentaram uma FR menor comparada com o restante dos dias e dos animais. (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias, por grupo de animais, da temperatura retal e frequência respiratória em marrãs gestantes inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora caninum*.

Dia	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	Temp.	FR	Temp.	FR	Temp.	FR	Temp.	FR
-2	36,8	26,7	37,7	13	36,97	32	36,3	23,7
2	37,97	26,7	38,6	29,3	37,3	38,7	37,1	23
5	36,73	29,4	38,7	31,3	37	28	36,1	27
7	36,73	30	38,4	28	36,8	26,7	36,47	30,7
14	37,03	28	37,78	28	36,83	26,7	36,33	27
21	36,57	22,7	37,28	28	36,07	21,4	36,47	26,7
28	36,1	22,7	38,25	34,7	36,13	21,4	NR	NR
35	36,7	32	37,68	29,3	36,8	23,7	NR	NR
42	36,9	25,4	37,8	25,3	36,5	26,7	NR	NR
55	36,67	27,7	37,1	24,3	37,37	23,7	NR	NR
70	NR	NR	37,1	22,7	NR	NR	NR	NR
85	NR	NR	37,1	22,7	NR	NR	NR	NR
100	NR	NR	36,4	21,3	NR	NR	NR	NR
115	NR	NR	36,3	24,7	NR	NR	NR	NR
130	NR	NR	36,8	25	NR	NR	NR	NR

Temp.: Temperatura; FR: Frequência respiratória; NR: Não realizado.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

5.4.2 Hemograma, leucograma e análises bioquímicas

Cinco dos nove animais inoculados apresentaram leucocitose no 7 DPI (LT: 25650; 23510; 23950; 26130; 30140), dois com neutrocitose (N: 10516; 11017) e três com linfocitose (L: 13594,5; 13635,8; 22906,4). Ainda, três animais apresentaram maiores quantidades de bastões (classificados como neutrófilos imaturos).

Quando avaliados os níveis séricos de AST e GGT, os três animais do grupo B, apresentaram altos níveis no 21 DPI (ALT: 148; 112; 198) e, em dois desses animais, esses níveis se mantiveram até o 28 DPI (ALT: 141; 86), voltando ao normal após esse período.

O restante dos hemogramas e bioquímicos das marrãs mantiveram-se normais durante o experimento. Não houve alterações nos hemogramas e análises bioquímicas da marrãs do grupo controle

5.4.3 Sorologia

5.4.3.1 Soro

Todas as marrãs do grupo A, mantiveram-se negativas durante todo o experimento.

Todas as marrãs dos grupos B e C apresentaram anticorpos IgG contra o protozoário no quinto dia pós inoculação. As fêmeas do grupo D apresentaram resultado positivo para IgG no sétimo dia pós inoculação (DPI).

Os maiores títulos de IgG, em todos os grupos inoculados, foram verificados entre os 14 e 28 DPI, sendo que na maioria dos animais esses valores decresceram após o 28 DPI, mantendo-se constante durante a gestação.

Já quando analisada a presença de IgM no soro das marrãs pós-inoculação, todas elas soroconverteram no quinto dia pós inoculação. O pico de produção de anticorpos foi no 14 DPI para todos os animais, sendo que a quantidade de anticorpos decresceu após esse período. Animais do Grupo B, que foram acompanhados até o 130 DPI, apresentaram resultados negativos para IgM entre 55 e 85 DPI, porém, no 100 DPI soroconverteram novamente com altos títulos de anticorpos, demonstrado, assim, uma possível reagudização da infecção por *N. caninum* (Tabela 2, Figura 3).

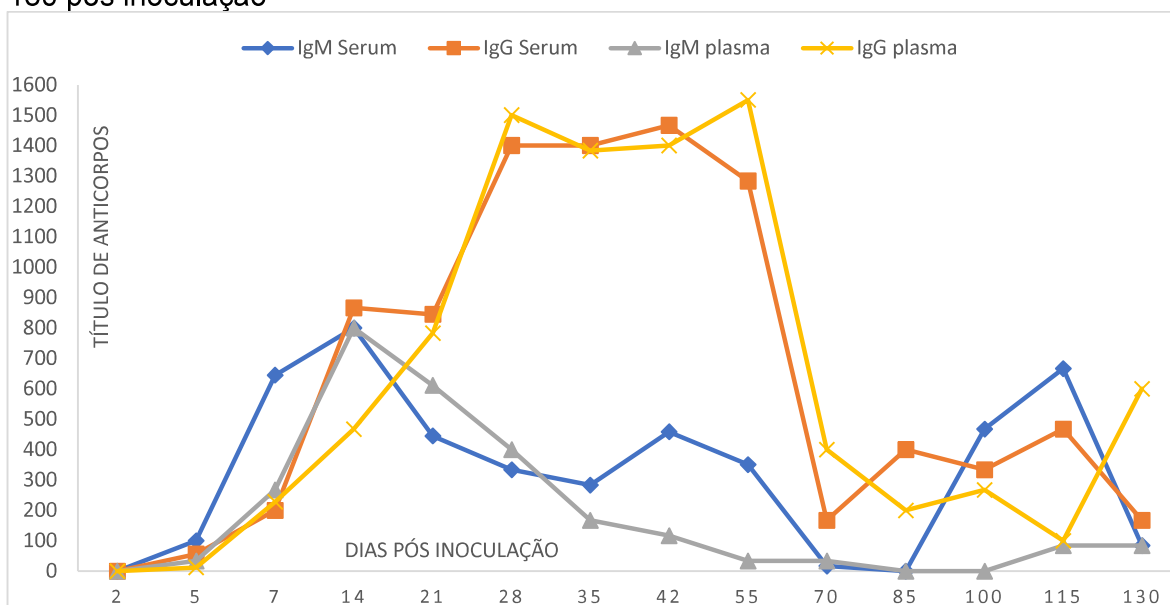
5.4.3.2 Plasma

Quando avaliada a presença de IgG contra *N. caninum* no plasma das marrãs verificou-se que apenas dois animais soroconverteram no quinto DPI, sendo uma do grupo B e outra do grupo D.

Assim como no soro, os maiores títulos de IgG em todos os grupos inoculados foram verificados entre os 14 e 28 DPI. A maioria dos animais não apresentou altos títulos, comparado com o soro, mantendo-se constante durante toda a gestação.

Já quando analisado o IgM no plasma, apenas quatro animais apresentaram resultado positivo no quinto DPI, sendo um do grupo B, um do grupo C e dois do grupo D. Após o sétimo DPI todos os animais apresentam anticorpos IgM contra o protozoário. Maiores títulos de anticorpos foram observados entre os 14 e 21 DPI, decaindo após esse período. Assim como no soro, alguns animais negativaram a partir do 55 DPI e a produção de anticorpos IgM retornou no 115 DPI (Tabela 2, Figura 3).

Figura 3- Médias de títulos de anticorpos IgG e IgM no soro e plasma de marrãs experimentalmente inoculadas com com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1, do dia 2 ao dia 130 pós inoculação



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Tabela 2 - Média, por grupo, das recíprocas de títulos de IgM e IgG contra *Neospora caninum* no soro e plasma de marrãs inoculadas com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1, do dia -2 ao dia 130 pós inoculação

Dia	Grupo B						Grupo C						Grupo D					
	IgM			IgG			IgM			IgG			IgM			IgG		
	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma	Soro	Plasma
-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	100	16,7	83,3	16,7	83,3	16,7	150	33,3	66,7	66,7	-	-	83,3	50	-	-	16,7	-
7	400	100	133,3	133,3	133,3	133,3	666,7	166,7	200	83,4	83,4	83,4	866,7	533,3	266,7	266,7	466,7	466,7
14	800	800	1466,7	366,7	366,7	366,7	800	800	466,7	233,4	233,4	233,4	800	800	666,7	666,7	800	800
21	266,7	800	266,7	216,7	216,7	216,7	666,7	600	1600	533,4	533,4	533,4	400	433,3	666,7	666,7	1600	1600
28	100	466,7	333,3	466,7	466,7	466,7	566,7	333,3	2466,7	2533,4	2533,4	2533,4	NR	NR	NR	NR	NR	NR
35	433,3	166,7	266,7	233,3	233,3	233,3	133,3	166,7	2533,4	2533,4	2533,4	2533,4	NR	NR	NR	NR	NR	NR
42	183,3	100	400	333,3	333,3	333,3	733,3	133,3	2533,4	2466,7	2466,7	2466,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
55	16,7	33,3	333,3	433,3	433,3	433,3	566,7	33,3	2233,4	2666,7	2666,7	2666,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
70	16,7	33,3	166,7	400	400	400	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
85	0	0	400	200	200	200	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
100	466,7	0	333,3	266,7	266,7	266,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
115	466,7	83,3	466,7	100	100	100	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
130	666,67	83,3	166,7	600	600	600	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

-: negativo

NR: não realizado

Fonte: Elaborado pela autora (2019)

5.4.3.3 Saliva e muco vaginal

Anticorpos IgG contra *N. caninum* foram detectados no muco vaginal sem diluição. Três animais, um de cada grupo inoculado, apresentaram resultado positivo a partir do 14 DPI. Dos animais inoculados, apenas três foram negativos em todas as coletas sendo um animal do grupo C e dois do grupo D (Tabela 3). Todos os animais foram negativos nas diluições a partir de 1:25.

A presença de anticorpos IgG contra *N. caninum* na saliva, foi observada nas três porcas dos grupos B e C. No grupo B, um animal foi positivo no 70 DPI, já no grupo C, um animal foi positivo no 28 DPI e outro no 42 DPI. O grupo D não apresentou animais positivos.

Já quando analisada IgM, os três animais do grupo B apresentaram anticorpos contra o *N. caninum* no muco vaginal a partir do 14 DPI, e apenas um animal (10) apresentou resultado positivo para IgM, no 28 DPI. Nenhum animal do grupo C, apresentou IgM contra *N. caninum* no muco vaginal.

Quando analisada a saliva para pesquisa de IgM, apenas um animal foi positivo, sendo esse do grupo C (8), a partir do 14 DPI, sendo positivo, também nos 21 e 35 DPI.

Tabela 3 - Resultados da pesquisa de anticorpos IgG (RIFI) contra *N. caninum* no muco vaginal de marrãs inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1

Dia	Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
	14	15	16	1	3	4	8	9	10	11	12	13
-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
21	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NR	NR	NR
35	-	-	-	+	-	-	-	-	+	NR	NR	NR
42	-	-	-	+	+	-	+	-	+	NR	NR	NR
55	-	-	-	+	+	-	+	-	-	NR	NR	NR
70	NR	NR	NR	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
85	NR	NR	NR	-	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
100	NR	NR	NR	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
115	NR	NR	NR	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
130	NR	NR	NR	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR

-: Negativo; +: Positivo; NR: Não realizado

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

5.4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Apenas dois animais, dos inoculados, apresentaram resultado positivo para *N. caninum* quando analisado o sangue para procura do DNA do protozoário através da técnica de PCR. Sendo um animal do grupo B e outro do grupo C, nos 5 e 7 DPI, respectivamente.

Já quando analisada a saliva das marrãs pela técnica de PCR, 33 amostras apresentaram resultado positivo para o protozoário, a partir do 2 DPI. Todos os animais inoculados apresentaram DNA do parasito na saliva durante o período experimental (Tabela 4).

Os resultados da PCR para *N. caninum* do muco vaginal demonstraram que foi possível detectar o protozoário em 17 amostras coletadas. A presença do protozoário foi detectada a partir do 2 DPI. Apenas três animais, dos nove inoculados, apresentaram resultados negativos para todas as amostras de muco vaginal, sendo dois animais do grupo C e um animal do grupo D (Tabela 4).

Todos os animais inoculados apresentaram resultado positivo na PCR em algum momento do período experimental. Ainda, os animais do grupo B, inoculados 30 dias antes da concepção, apresentaram resultados positivos no muco vaginal e/ou saliva até o 35 DPI; nas coletas aos 42, 55 e 70 DPI todos os animais foram negativos, voltando a apresentar resultados positivos aos 85 e 100 DPI, resultados esses, que condizem com os encontrados quando analisado os títulos de IgM no soro e/ou plasma.

5.4.5 Coeficiente de Concordância De Kappa

Tanto os resultados da pesquisa de IgG e IgM no soro, saliva, muco vaginal e plasma, quanto os resultados da PCR do sangue, saliva e muco vaginal foram analisados por meio do Coeficiente de concordância de Kappa.

Quando avaliado os resultados da imunoglobulina G, obteve-se concordância quase perfeita entre soro e plasma (0,83 (IC: 0,70-0,96)) e fraca concordância entre soro e saliva (0,013 (IC: -0,35-0,38)), soro e muco vaginal (0,07 (IC: -0,25-0,40)), plasma e saliva (0,01 (IC: -0,34-0,38)), plasma e muco vaginal (0,08 (-0,23-0,40)) e saliva e muco vaginal (0,18 (IC: -0,14-0,51)).

Os resultados do coeficiente de Kappa para IgM apresentaram forte concordância entre soro e plasma (0,63 (IC: 0,43-0,69)), fraca concordância entre soro e saliva (0,01 (IC: -0,34-0,37)), soro e muco vaginal (0,04 (IC: -0,29-0,39)), plasma e saliva (0,02 (IC: -0,33-

0,38)), plasma e muco vaginal (0,05 (IC: -0,28-0,39)) e concordância insignificante entre muco vaginal e saliva (-0,04 (IC: -0,2-0,12)).

Analisando o coeficiente de concordância de Kappa para os resultados da PCR há concordância insignificante entre todas as amostras coletadas: sangue e saliva (-0,02 (IC: -0,32-0,37)), sangue e muco vaginal (-0,03 (IC: -0,35-0,28)) e saliva e muco vaginal (-0,06 (IC: -0,28-0,16)).

Tabela 4- Resultado da PCR de *Neospora caninum* em saliva e muco vaginal de marrãs experimentalmente inoculadas com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1, do dia 2 ao dia 130 pós inoculação

	Grupo B						Grupo C						Grupo D					
	1		3		4		8		9		10		11		12		13	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
7	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
14	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
21	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
28	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
35	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
42	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
55	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
70	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
85	-	+	-	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
100	+	-	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
115	+	-	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
130	+	-	+	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

+ = Positivo / - = Negativo / NR = Não Realizado

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

5.5 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo realizado avaliando os sinais clínicos da neosporose em suínos, além de formas de diagnóstico do protozoário.

Durante todo o período gestacional e pós inoculação foram realizados exames clínicos nos animais inoculados. Dois animais, um do grupo C e outro do grupo D, apresentaram hipotermia e apatia logo após a inoculação (5 e 7 DPI). A hipotermia geralmente não é associada com infecção por *N. caninum* nos animais sendo, na maioria das vezes, verificada hipertermia (PORTO et al., 2016). Porém, hipotermia já foi relatada em um cordeiro, recém-nascido, proveniente de uma fêmea inoculada com *N. caninum*

(PIVATTO, 2017). Além de ser relatada hipotermia em filhotes de gatos infectados com *T. gondii* via transplacentária ou transmamária (GALVÃO et al., 2014) e em uma gata com lesão cutânea e dificuldade respiratória, causadas pelo *T. gondii* (ANFRAY et al., 2005).

Quando observada a frequência respiratória, não houve alteração nos períodos aferidos. Demonstrado, que o *N. caninum* não afeta esse parâmetro na análise clínica dos animais.

Ainda, foi observada leucocitose por linfocitose e/ou neutrofilia em cinco das nove marrãs inoculadas no 7 DPI, podendo estar associada com a infecção por *N. caninum*. São raros os trabalhos envolvendo *N. caninum* que relatam leucocitose. Pivatto (2017), inoculou taquizoítos da cepa Nc-1 de *N. caninum* em ovelhas gestantes e observou leucocitose por eosinofilia nos 14 e 21 DPI. Valeriano et al. (2015) também relataram leucocitose e linfocitose em um cão com sinal neurológico devido à infecção por *N. caninum*. Já Serrano et al. (2011) observaram leucopenia em fêmeas bovinas cronicamente infectadas com o protozoário.

Três animais, dos inoculados, apresentaram números maiores de bastões no 7 DPI. Os bastões são neutrófilos imaturos e geralmente são encontrados em casos de infecções agudas onde há a necessidade de uma maior demanda de leucócitos para combatê-las. Podendo, portanto, estar associada com a inoculação dos taquizoítos de *N. caninum*.

Quando avaliadas as enzimas hepáticas ALT e GGT, após inoculação, os três animais do grupo B apresentaram níveis altos de ALT. Esta enzima está relacionada a lesões hepáticas e já foi associada com a infecção por *N. caninum* em cães com lesões cutâneas (MURAKAMI et al., 2017) e com a infecção por *T. gondii* em cães, devido a necrose hepática (DUBEY e LAPPIN, 2006).

Quando avaliados os resultados da sorologia, observou-se que todas as marrãs soroconverteram a partir do 5 DPI. Imunoglobulinas da classe M estão associadas com a fase aguda da infecção, já IgG são encontradas em maior quantidade na fase crônica da infecção, se mantendo presente por longos períodos. Em suínos, com esse estudo, pode-se constatar que o início da detecção de IgM ocorre a partir do quinto dia pós infecção, com os títulos aumentando até o dia 14 pós infecção e então a produção começa a diminuir, ficando indetectável, no soro e plasma, a partir do dia 55-70 pós infecção, respectivamente. Já as imunoglobulinas G, começam a ser detectadas a partir do quinto dia pós infecção, apresentando picos maiores de produção entre os dias 14 e 28 pós inoculação, mantendo-se constante após esse período. Esses resultados demonstram, assim como outros autores (CADORE et al., 2010), que para a detecção da infecção por *N. caninum* em animais de

rebanho, nesse caso de suínos, a procura de IgG mostra-se mais eficiente por permanecer mais tempo na corrente sanguínea dos animais.

Mineo (2007) avaliou a resposta imune, através da RIFI, de um bezerro e de oito cães inoculados com *N. caninum*, no bezerro foi possível detectar IgM e IgG a partir do dia 7 pós inoculação, com pico de produção de IgM no dia 35 pós inoculação, decaindo após esse período. Já nos cães inoculados foi possível detectar IgM contra o protozoário a partir do dia 35 pós inoculação e IgG a partir do dia 5 pós inoculação, mantendo títulos baixos durante o experimento. Avaliando esses resultados é possível afirmar que a resposta imune de suínos frente a infecções de *N. caninum* é mais precoce quando comparado a cães e bovinos.

Saliva e muco vaginal não apresentaram resultados satisfatórios para a procura de anticorpos IgG e/ou IgM em suínos. Quando avaliada a saliva, apenas três animais apresentaram resultado positivo para IgG e um para IgM, durante todo o acompanhamento pós inoculação. Já quando avaliado o muco vaginal, apenas três animais foram negativos para IgG e três animais foram positivos para IgM durante todo o experimento. Apesar do muco vaginal ter apresentado um número maior de animais positivos, eles não se mantiveram positivos em todas as coletas.

Em bovinos, Ooi et al. (2000) analisaram amostras de soro, saliva e muco vaginal de 613 bovinos pela técnica de RIFI (IgG), encontrando um maior número de animais positivos para *N. caninum* no soro, seguido do muco vaginal e saliva. Resultados esses, que apresentam concordância com os encontrados em suínos.

Ainda, foi avaliada a parasitemia pós inoculação, por meio da PCR da capa leucocitária, da saliva e do muco vaginal. Apenas dois animais apresentaram resultado positivo quando analisada a capa leucocitária, seis animais quando analisado o muco vaginal e todos os animais foram positivos quando analisada a saliva, apresentando resultados positivos a partir do 2 DPI. Esses resultados sugerem a saliva como alternativa para coleta de amostras a campo para procura do DNA do protozoário, com resultados superiores aos encontrados quando utilizados capa leucocitária ou muco vaginal.

Amostras de saliva raramente são utilizadas como forma de diagnóstico de *N. caninum*, porém tratando-se de *T. gondii* há vários estudos que relacionam a sua presença em saliva de animais e humanos (BRESCIANI et al.; 2008; VITOR et al., 1991; TERRAGNA et al., 1984). Com esse estudo podemos concluir que, assim com o *T. gondii*, o *N. caninum* também pode ser encontrado na saliva de animais infectados.

Animais do grupo B, foram acompanhados até o 130 DPI, um período maior comparando-se com os outros grupos inoculados. Esses animais foram inoculados 30 dias

antes da concepção, estando em infecção crônica no período gestacional. Animais desse grupo, após um período sem apresentarem anticorpos IgM no soro e plasma (Figura 3), voltaram a apresentar anticorpos desse tipo no 100 DPI. Quando analisado os resultados da PCR, percebe-se que não foi possível detectar DNA no parasito, tanto na saliva, quanto no muco vaginal e no sangue, dos 42 a 70 DPI, voltando a aparecer o protozoário no 85 DPI (Tabela 4). Relacionando o resultado com os encontrados na RIFI para procura de anticorpos IgM (Tabela 2), pode-se afirmar que houve a reagudização da infecção nesse período (segundo terço gestacional), pela presença de anticorpos e parasitemia. Resultados esses semelhantes a que ocorre em outras espécies animais como bovinos e ovinos onde há transmissão transplacentária endógena (MCALLISTER, 2016; JOLLEY et al., 1999).

Comparando (teste de kappa) as técnicas realizadas com todas as amostras coletadas de suínos para a procura de anticorpos contra o protozoário e DNA do *N. caninum*, tem-se que para a realização da sorologia pode-se utilizar tanto soro quanto plasma, para a pesquisa de IgG e de IgM, não havendo alteração nos resultados. Esses dados já foram relatados na literatura para outras espécies de animais e de protozoários, como o *T. gondii*, utilizando a técnica de RIFI (NAVARRO et al., 1997). Já para a técnica de PCR, não houve concordância entre as amostras coletadas (saliva, muco vaginal e sangue), porém a que apresentou maior número de animais positivos, ao longo do experimento, foi a saliva, demonstrando ser, entre as amostras colhidas, a melhor para detectar o protozoário em rebanhos suínos. Salienta-se também, que a dificuldade para a colheita de saliva é menor quando comparada à colheita de sangue, podendo ser uma alternativa para o diagnóstico de neosporose.

5.6 CONCLUSÃO

Neospora caninum infecta suínos podendo causar sinais clínicos como hipotermia e leucocitose na fase aguda de infecção.

A infecção pelo protozoário pode reagudizar em suínos cronicamente infectados durante a gestação.

Para diagnóstico sorológico pode-se utilizar como amostras tanto soro quanto plasma, apresentando resultados similares. Já para a procura de antígeno pela PCR recomenda-se a colheita de saliva, pois apresenta um número maior de animais positivos comparando-se com o sangue e com o muco vaginal.

5.7 REFERÊNCIAS

- ANFRAY, P.; BONETTI, C.; FABBRINI, F.; MAGNINO, S.; MANCIANTI, F.; ABRAMO, F. Feline cutaneous toxoplasmosis: a case report. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 131-136, 2005.
- AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J.; ALVES, C. J.; GUIMARAES FILHO, A. A. M.; OLIVEIRA, R. M.; MAKSIMOV, P.; SHARES, G.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 80-84, 2010.
- BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; NAVARRO, I. T.; TONIOLLO, G. H.; SAKAMOTO, C. A. M.; ARANTES, T. P.; GENNARI, S. M. Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 189-202, 2008.
- CADORE, G. C.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. IgM and IgG as markers of infection transplacental *Neospora caninum* in bovine fetuses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 551-553, 2010.
- CERQUEIRA-CEZAR, C. K.; PEDERSEN, K.; CALERO-BERNAL, R.; KWOK, O. C.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 35-37, 2016.
- DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3.ed. Philadelphia: **Saunders Elsevier**, 2006. Cap. 80, p.754-775.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Veterinary Medical Association**, v. 57, n. 3, p. 329-336, 1996.
- GALVÃO, A. L. B.; VACONCELLOS, A. L.; NAVARRO, I. T.; BRESCIANI, K. D. S. Clinical aspects of toxoplasmosis in small animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 393-410, 2014.
- JENSEN, L.; JENSEN, T. K.; LIND, P.; HENRIKSEN, S. A.; UGGLA, A.; BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 475-482, 1998.

JOLLEY, W. R.; MCALLISTER M. M., MCGUIRE, A. M.; WILLS, R. A. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 251-257, 1999.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016.

MINEO, T. W. P. Estudo da resposta imune celular e humoral de cães frente à infecção oral por *Neospora caninum*. 2007. Doutorado em Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2007.

MULLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2850–2852, 1996.

MURAKAMI, V. Y.; MAIA, S. R.; CORIS, J. G. F.; SEIXAS, T. M. P. Reação em cadeia de polimerase (PCR) de líquido cefalorraquidiano, um meio alternativo para o diagnóstico de neosporose canina – relato de 2 casos. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 29, p. 1-7, 2017.

NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; OGAWA, L.; KANO, F. S. Estudo comparativo entre soro e plasma na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pela técnica de imunofluorescência indireta em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, 1996. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 18, n. 1, p. 15-21, 1997.

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**, v. 7, p. 273-275, 1995.

PIVATTO, R. A. *Neospora caninum*: infecção experimental em ovelhas e avaliação da possibilidade de transmissão congênita. 2017. Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

PORTO, W. J. N.; REGIDOR-CERRILLO, J.; KIM, P. C. P.; BENAVIDES, J.; SILVA, A. C. S.; HORCAJO, P.; OLIVEIRA, A. A. F.; FERRE, I.; MOTA, R. A.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. **Veterinary Research**, v. 47, n. 29, p. 1-10, 2016.

OOI, H.K.; HUANG, C.C.; YANG, C.H.;v LEE, S.H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

SERRANO, B.; ALMERIA, S.; GARCIA-ISPIERTO, I.; YANIZ, J. L.; ABDELFATTAH-HASSAN, A.; LOPEZ-GATIUS, F. Peripheral white blood cells count throughout pregnancy in non-aborting *Neospora caninum*-seronegative and seropositive high-producing dairy cows in a Holstein Friesian herd. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 3, p. 457-462, 2011.

TERRAGNA, A.; MORANDI, N.; CANESSA, A.; PELLEGRINO, C. The occurrence of *Toxoplasma gondii* in saliva. **Tropenmed Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 9-10, 1984.

VALERIANO, K. C.; GORRICO, C. M.; GIMENES, P. J.; CUSTODIO, N. S.; SALOMÃO, R. L.; LEGA-PALAZZO, E.; CAMPOS, A. G. Neosporosis in canine puppy: case report. **Ars Veterinária**, v. 31, n. 2, p. 72, 2015.

VITOR, R.W.A.; PINTO, J.B. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 2, p.147-154, 1991.

WILLIAMS, D. J. L.; MCGARRY, J.; GUY, F.; BARBER, J.; TREES, A. J. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. **Veterinary Record**, v. 140, n. 13, p. 328–331, 1997.

6 ARTIGO 2

(Publicado em *Veterinary Parasitology* - <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108934>)

***Neospora caninum* causa problemas reprodutivos em suínos?**

6.1 RESUMO

Distúrbios reprodutivos, associados à infecção por *Neospora caninum*, já foram verificados em diversas espécies animais, como bovinos, ovinos e caprinos. Em suínos são raros os trabalhos envolvendo esse parasito. O objetivo desse trabalho foi verificar a transmissão transplacentária de *N. caninum* em suínos durante diferentes estágios da gestação. Foram selecionadas 12 fêmeas, híginas, soronegativas para *N. caninum* e *T. gondii* e separadas em quatro grupos contendo três animais cada. Os animais do Grupo A foram mantidos como controle e os animais dos grupos B, C e D foram inoculados, via intravenosa, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* 30 dias antes da concepção e aos 45 e 90 dias de gestação, respectivamente. Foi realizada a coleta de sangue das fêmeas periodicamente para confirmar a infecção por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgG e IgM, para confirmar a infecção. No nascimento, foi realizado a coleta de sangue dos leitões e então eles foram submetidos a eutanásia para a coleta de cérebro, coração, pulmão, fígado e diafragma para a realização da PCR. Todas as mães inoculadas soroconverteram (IgG) a partir do sétimo dia após a inoculação. Nove das 12 fêmeas expulsaram 24 fetos mumificados no momento do parto, sendo duas do grupo A (oito), duas do grupo B (quatro), as três do grupo C (nove) e duas do grupo D (três). Dos 24 fetos mumificados, nove foram positivos no PCR para *N. caninum*, sendo um (25%) feto do grupo B, sete (77,8%) do grupo C, e um (33,3%) do grupo D. Houve o nascimento de 126 leitões vivos. Quando analisados os órgãos dos leitões provenientes de fêmeas inoculadas, pela PCR, para detecção de *N. caninum*, verificou-se que 88 (93,61%) foram positivos. Todas as mães inoculadas deram origem a pelo menos um leitão positivo. Demonstrando, que há transmissão transplacentária em diferentes fases de gestação, independente do momento de infecção.

Palavras-chave: neosporose, mães, mumificados, leitões.

6.2 INTRODUÇÃO

Protozoário que infecta diversas espécies animais, *Neospora caninum* é reconhecido por causar prejuízos, principalmente em bovinos. Os principais sinais clínicos estão relacionados com desordens reprodutivas, notadamente abortos e natimortos (CANTÓN et al., 2014; MCALLISTER, 2016) em ruminantes, e problemas neuromusculares em cães (MCALLISTER, 2016).

São raros os trabalhos realizados com o objetivo de verificar os efeitos da infecção do *N. caninum* em suínos. Trabalhos de ocorrência foram realizados em diversos países. Em suínos domésticos as prevalências variam de 3,1 a 18,9% em diversas partes do mundo (HELMICK et al., 2002; BARTOVA e SEDLAK et al., 2011; SHARMA et al., 2015; FEITOSA et al., 2014, SILVA et al., 2017), sendo a maior prevalência detectada em suínos no estado de Santa Catarina, Brasil, maior estado produtor no país. Já quando avaliada a prevalência em suínos silvestres, essas variam de 4,9 a 58,3% (KAMGA-WALADJO et al., 2009; CERQUEIRA-CEZAR et al., 2016; SOARES et al., 2016; LOPES et al., 2018). O que ainda não está claro é a patogenia da doença e suas consequências na espécie suína.

Os principais problemas em matrizes suínas são de ordem reprodutiva. A queda do número de leitões/porca/ano resulta em perdas econômicas (BORTOLETTO et al., 2014). Diversos são os patógenos responsáveis por desordens reprodutivas em suínos, podendo ser vírus, bactérias (BORTOLETTO et al., 2014) ou protozoários como o *Toxoplasma gondii* (BASSO et al., 2015).

O correto diagnóstico das causas de aborto é importante para a adoção de tratamento, controle e prevenção adequados. Como a infecção natural por *N. caninum* ainda não foi correlacionada com desordens reprodutivas em suínos, a disseminação do parasito pode estar sendo facilitada devido à falta de medidas de controle e prevenção.

Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito da infecção experimental, com taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*, em matrizes suínas em diferentes estágios da gestação.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Comitê de Ética em Experimentação Animal

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CAV/UDESC, sob protocolo número 7997170717, em 21.08.2017.

6.3.2 Seleção dos Animais

Foram selecionadas 12 marrãs, primíparas, com aproximadamente 10 meses de idade e 130kg, híginas, da linhagem comercial Agroceres Pic Camborough. Como critério de seleção os animais deveriam ser soronegativos (RIFI) para *T. gondii* e *N. caninum*

Os animais foram mantidos em baias individuais, no setor de suinocultura, do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), onde receberam ração balanceada, água e manejo de rotina.

As marrãs e o macho doador de sêmen (soronegativo (RIFI) para *T. gondii* e *N. caninum*) receberam duas doses de vacina contra *Parvovirus*, *Erisipela*, *Leptospira* (Venco® Part. 003116, Fab. out/16, Val. out/18) e *Circovirus* (Venco® Part. 005116, Fab. nov/16, Val. nov/18), 60 dias antes da concepção.

O cio das marrãs foi detectado por meio do contato direto, diariamente, com um cachaço hígin. Após a detecção do cio as fêmeas foram inseminadas a cada 24 horas (até aceitação do macho), via intrauterina, com sêmen fresco diluído, armazenado por no máximo 72 horas entre 15°C e 18°C.

O sêmen foi coletado de um macho com fertilidade previamente conhecida. O animal foi mantido em baia individual, no setor de suinocultura, do centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O ejaculado foi coletado por meio do método da mão-enluvada, usando um copo plástico e filtro, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel, para descarte posterior. Após a coleta, o sêmen foi diluído na proporção 1:1 com DiluPork BTS⁺®.

6.3.3 Inoculação

As marrãs foram separadas em quatro grupos de três animais cada. Os animais do grupo A foram mantidos como controle. Os animais dos grupos B, C e D foram inoculados 30 dias antes da concepção e aos 45 e 90 dias de gestação, respectivamente.

O inóculo foi constituído de $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*, via intravenosa, obtidos por meio de cultivo celular.

A gestação foi confirmada com o uso da ultrassonografia transabdominal, sendo essa realizada aos 45 dias e aos 90 dias de gestação para avaliar a manutenção da gestação e a viabilidade fetal.

6.3.4 Pré-parto

No período pós inseminação, até o dia 110 de gestação, as mães foram mantidas em baias individuais e observadas três vezes por dia, para detecção de possível aborto. No dia 110 de gestação as fêmeas foram transferidas para gaiolas de maternidade, para o parto.

O parto foi induzido com 0,7mL, via intramuscular, de Cloprostenol (Sincrocio®) (Part. 0009/17; Fab. set/17, Val. set/19) 24 horas antes da previsão do parto (114º dia de gestação).

6.3.5 Colheita de amostras

a) Mães

Amostras de sangue foram colhidas a partir de dois antes da inoculação até o dia do parto, portanto, dos animais do grupo B foram coletadas amostras nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55, 70, 85, 100, 115, 130 DPI (Dias Pós Inoculação), do grupo C, nos dias -2, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 55 DPI, e do grupo D, -2, 2, 5, 7, 14, 21 DPI. Dos animais do grupo A (controle) foram coletadas amostras nos mesmos dias que dos animais do grupo C.

Das amostras de sangue colhidas foram obtidos soro (para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum*, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta-RIFI) e camada leucocitária para detecção de parasitemia, por meio da PCR.

Durante o parto, foram também colhidas amostra de leite (Colostro) e de líquido amniótico, para a realização da PCR e RIFI (IgG e IgM).

b) Leitões

Dos leitões nascidos a termo, foi colhido sangue imediatamente após o nascimento (pré-colostral) para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM (RIFI) contra o agente e de DNA do parasito (parasitemia) por meio da PCR (papa de leucócitos).

Ainda, foi realizada a coleta de saliva, por meio de *swabs*, sendo esses colocados em tubos cônicos contendo 200µl de PBS, mantidos em repouso por uma hora e então centrifugados a 1700g por 3 min. As amostras obtidas foram armazenadas (-20°C) até processamento. Para essas amostras foram realizadas as técnicas da PCR e RIFI.

Imediatamente após a colheita de sangue, os leitões foram pesados e medidos (Figura 4) e então foram colocados junto a mãe para ingestão do colostro.

A eutanásia dos leitões foi executada conforme o 'Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia dos Animais', modificado em janeiro/2017, que recomenda o uso CO₂ na concentração de 70%.

Foi realizada a necropsia de todos os leitões e fragmentos do sistema nervoso central (SNC), de pulmão, de fígado, de coração e de diafragma, além das placentas, foram coletados para a pesquisa do agente por meio da PCR.

Dos fetos mumificados foi mensurado o tamanho, com auxílio de fita métrica, para estimar a idade da morte (Figura 4). A estimativa da idade gestacional foi realizada por meio da fórmula ($21+3X$ medida feto (cm)) (PESCADOR et al., 2010). Foram ainda coletados fragmentos de SNC, de coração e de pulmão para PCR.

Figura 4 - Desenho esquemático da mensuração do tamanho de leitões/fetos, sendo realizada através da medida da nuca até a inserção da cauda



Fonte: BARLOW, A. A guide to the investigation of porcine abortion/stillbirth. **Farm Animal: In Practice**, 559-564, 1998.

6.3.6 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Foi realizada RIFI para pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *N. caninum* em todas as amostras de soro, plasma, leite, líquido amniótico e saliva obtidas dos animais (porcas e leitões). O ponto de corte utilizado foi 1:50 para soro, plasma, leite e líquido amniótico (PARÉ et al., 1995) e 1:25 para saliva (AZEVEDO et al., 2010).

6.3.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para realização da PCR, os órgãos/tecidos colhidos durante a necropsia foram lavados com PBS (pH 7,2) no momento da coleta e armazenados a -20°C até seu processamento.

Todos os órgãos coletados foram macerados individualmente e a extração de DNA pela técnica de fenol-clorofórmio (órgãos, capa leucocitária, saliva, leite, líquido amniótico) foi realizada conforme Cavalcante (2010).

Para a PCR, a região Nc5 (5,10) foi selecionada como sequência alvo para a amplificação de DNA. Para isso foram utilizados os *primers* Np21/Np6 (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTA-3')/(5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') (MULLER et al., 1996). A reação foi realizada com um volume final de 50µL, contendo tampão 10X, 200µM DNTP, 1,5mM MgCl₂, 20µM de cada primer, 1,25U Taq, com desnaturação inicial a 95°C-5min, 40 ciclos a 94°C-1min/63°C-1min/74°C-3,5min e extensão final a 74°C-10min. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%) para visualização. Como controles positivo e negativo foram utilizados DNA extraído de taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* e água ultrapura autoclavada, respectivamente.

6.3.8 Bioensaio em cães

Foram selecionados três cães, sem raça definida, com aproximadamente 45 dias de idade, soronegativos (RIFI, IgG) para *T. gondii* e *N. caninum*.

O cão 1, macho, foi vinculado ao grupo de porcas B; os cães 2 e 3, fêmeas, foram vinculados aos grupos de porcas C e D, respectivamente.

Todos os cães foram vermifugados (5mg/kg de praziquantel, 14,5mg/kg pirantel e 15mg/kg de febantel) 15 dias antes da inoculação e mantidos em gaiolas individuais com alimentação e água "*ad libitum*".

Para a inoculação, os cães foram mantidos em jejum prévio por 12 horas e então receberam, por três dias consecutivos e três vezes por dia, placenta das porcas e SNC dos leitões dos respectivos grupos aos quais estavam vinculados, como única fonte de alimentação.

Durante 20 dias, após a inoculação, todo o volume diário de fezes, de cada cão, foi colhido. As fezes foram remetidas ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do CAV/UDESC e analisadas por meio da técnica de Sheather modificado (SHEATHER, 1923).

No dia 25 pós inoculação foi realizada a colheita de sangue dos cães, para obtenção de soro para detecção de IgG (RIFI) contra *N. caninum*.

6.3.9 Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os animais divididos em quatro grupos com três repetições.

Para os resultados obtidos com a leitegada (tamanho da leitegada, tamanho, peso e sexo dos leitões, peso da placenta e estimativa do peso da placenta dos leitões) foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$), utilizando o *software* Sisvar.

Para verificar a concordância entre os testes empregados em diversos tecidos e fluidos foi utilizado o Coeficiente de Concordância de Kappa (coeficiente de confiança: 95%), considerado concordância insignificante valores abaixo de zero, fraca entre 0 e 0,2, razoável entre 0,21 e 0,4, moderada entre 0,41 e 0,6, forte entre 0,61 e 0,8 e quase perfeita entre 0,81 e 1 (LANDIS e KOCK, 1977).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Marrãs

Após a inoculação da cepa Nc1 de *N. caninum*, todas as marrãs dos grupos B e C soroconverteram (IgG) no quinto dia pós inoculação (DPI). As fêmeas do grupo D soroconverteram no sétimo DPI.

Os maiores títulos de IgG, em todos os grupos inoculados, foram verificados entre os 14 e 28 DPI, chegando a 6400, sendo que na maioria dos animais esses valores decresceram após o 28 DPI, mantendo-se constante durante a gestação.

Já para IgM, verificou-se que todos os animais inoculados soroconverteram no quinto dia pós inoculação. O pico de produção de anticorpos em todas as marrãs foi entre o sete e 21 DPI, atingindo título de 1600 em alguns animais. Porém, uma das marrãs do grupo C, apresentou título de anticorpos IgM 1600 somente no 42 DPI, fato esse precedido de uma diminuição na produção de anticorpos (100) no 35 DPI.

Das marrãs do grupo B, foram coletadas amostras de sangue até o 130 DPI. Duas fêmeas desse grupo soronegativaram (IgM) no 55 DPI, e a outra no 70 DPI. No entanto, no

100 DPI as três marrãs novamente soroconverteram, mantendo-se positivas até o momento do parto, chegando a títulos de anticorpos IgM de 1600.

Quando avaliado os anticorpos IgG e IgM no leite, verificou-se que todas as nove marrãs inoculadas foram positivas para IgG e oito foram também positivas para IgM. Os títulos de IgG no leite variaram de 400 a 409600 (Tabela 7). As marrãs do grupo B apresentaram títulos de 800, 400 e 3200, já as do grupo C, 12800, 1600 e 409600, e as do grupo D, 25600, 25600 e 51200. Já os títulos de anticorpos IgM no leite variaram de 100 a 800. As marrãs do grupo B apresentaram títulos de 100, negativo, 100, do grupo C, 200, 200 e 400, e as do grupo D, 400, 200 e 800.

Ainda, foi avaliada a ocorrência de anticorpos IgG e IgM no líquido amniótico. Apenas cinco fêmeas apresentaram resultado positivo para IgG, sendo duas do grupo C e as três do grupo D. Os títulos variaram de 100 a 400. Todos os animais apresentaram resultado negativo quando pesquisado IgM no líquido amniótico.

Todas as fêmeas do grupo A mantiveram-se negativas durante toda a gestação e no momento do parto.

6.4.2 Leitões

Nenhuma fêmea apresentou aborto, e apenas uma do grupo A (controle) expulsou um leitão natimorto após 12 horas do início do parto.

Nove das 12 fêmeas expulsaram 24 fetos mumificados no momento do parto, sendo duas do grupo A (oito), duas do grupo B (quatro), as três do grupo C (nove) e duas do grupo D (três) (Figura 5). Na tabela 5 estão os dados da estimativa da idade gestacional em que ocorreram as mortes fetais e os resultados da pesquisa de DNA do parasito (PCR) nos tecidos dos fetos mumificados.

Figura 5 - Fetos mumificados provenientes de marrãs inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora caninum*



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Seis leitões nasceram com má formação fetal. Três com epiteliogênese imperfeita de membros anteriores, sendo dois descendentes de uma fêmea do grupo D e um de uma fêmea do grupo A. Um leitão nasceu com atresia anal, proveniente de uma fêmea do grupo B. Dois leitões nasceram com duplicação parcial na região facial, possuindo duas línguas e o focinho bifido, provenientes dos grupos B e C, respectivamente. Os dois foram eutanasiados logo após o nascimento (Figura 6).

Figura 6 - Má formação fetal em leitões. A) epiteliogênese imperfeita no membro anterior; B) duplicação parcial na região facial



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Tabela 5 - Número, tamanho, estimativa da idade gestacional e resultados da pesquisa de DNA do parasito (PCR) nos tecidos de fetos mumificados provenientes de marrãs inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora caninum*

Grupo	Porca	Nº	Tamanho (cm)	EIG (dias)	PCR coração	PCR pulmão	PCR cérebro
A	14	1	8,5	47	-	-	-
	14	2	8,5	47	-	-	-
	14	3	8,5	47	-	-	-
	14	4	23,5	92	-	-	-
	16	5	4,5	34	-	-	-
	16	6	7,5	44	-	-	-
	16	7	11,5	56	-	-	-
	16	8	13,5	62	-	-	-
B	1	9	4,5	34	-	-	-
	1	10	11	54	-	-	-
	1	11	12	57	+	-	+
	3	12	28	105	-	-	-
C	8	13	9	48	-	-	+
	9	14	4,5	34	-	-	-
	9	15	9	48	-	-	-
	10	16	4,5	34	-	-	+
	10	17	9,5	50	+	+	+
	10	18	10,5	53	+	+	+
	10	19	15	66	-	+	+
	10	20	15,5	68	+	-	+
	10	21	18	75	-	+	+
D	11	22	15,5	68	-	-	-
	12	23	13	60	-	-	-
	12	24	13	60	-	-	+

EIG: estimativa da idade gestacional; - = Resultado negativo na PCR; + = Resultado positivo na PCR

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Dos 126 leitões que nasceram vivos, 20 morreram entre o nascimento e as primeiras 24 horas. Diversas foram as causas, como esmagamento, falta de ingestão de colostro, hemorragia umbilical, hipotermia devido ao frio intenso na noite do parto. Dos 20 animais, seis eram do grupo A, seis eram do grupo B, cinco do grupo C e três do grupo D.

6.4.2.1. Tamanho, peso e sexo

Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os grupos quando avaliados o tamanho da leitegada, o tamanho, peso e sexo dos leitões, o peso da placenta e a estimativa do peso da placenta de cada leitão (Tabela 6).

Tabela 6 - Tamanho da leitegada (n), tamanho (cm), peso (g) e sexo dos leitões, peso (g) da placenta e estimativa do peso (g) da placenta dos leitões em fêmeas suínas inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora caninum*

	Leitegada				Sexo		Placenta	
	Porca	Número leitões	Peso médio	TM	F	M	Peso	PMPL
Grupo A	14	11	1265	30	5	6	3050	277,3
	15	12	1156	29	4	9	1750	145,8
	16	9	1107	28	1	8	2230	123
	Total	32	1176	29	10	23	2343,3	182
	(Média)	(10,6)			(3,4)	(7,7)		
Grupo B	1	13	1093	25	4	9	1910	147
	3	9	1130	30	4	5	2145	238,3
	4	13	1175	25	8	5	3660	281,5
	Total	35	1133	26,7	16	19	2571,7	222,3
	(Média)	(11,6)			(5,3)	(6,3)		
Grupo C	8	10	1321	27	6	4	2380	238
	9	10	1257	26	4	6	2095	209,5
	10	4	1239	26	0	4	1450	362,5
	Total	24	1272,3	26,3	10	14	1975	270
	(Média)	(8)			(3,3)	(4,7)		
Grupo D	11	10	1216	30	4	6	2145	214,5
	12	10	1258	30	4	6	2240	224
	13	15	1085	27	6	9	3085	205,7
	Total	35	1186,3	29	14	21	2490	214,7
	(Média)	(11,7)			(4,7)	(7)		

TM: Tamanho médio; F: Fêmea; M: Macho; PMPL: Peso médio da placenta/leitão

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

6.4.2.2. Sorologia

a) IgG

Apenas leitões dos Grupo C e D nasceram com anticorpos IgG contra o *N. caninum*. No total foram 17 leitões positivos (16 positivos no soro e plasma e um positivo somente no plasma), antes da ingestão do colostro. Desses, dois eram provenientes de uma fêmea do grupo C e 15 das três fêmeas do grupo D (Tabela 7).

As titulações de anticorpos no soro e plasma, observadas no momento 0 (pré-colostral), variaram de 50 a 1600. Os dois animais do grupo C, apresentaram titulações de 1600, assim como dois animais do grupo D, sendo um no soro e outro no plasma.

Quando analisado o soro dos leitões 24 horas após o nascimento (após ingestão de colostro) todos os leitões dos grupos C e D, e 93,1% dos leitões do grupo B, apresentaram anticorpos IgG contra o protozoário (Tabela 7).

As titulações de Imunoglobulina da classe G, no momento 24, variaram de 50 a 51200. Os maiores títulos de IgG foram observados nos leitões provenientes dos grupos D (até 51200), C (até 12800) e B (até 400).

Quando pesquisada a ocorrência de IgG na saliva dos leitões, 36 deles apresentaram anticorpos no momento 0, sendo oito (22,85%) do grupo B, 10 (41,66%) do grupo C e 18 (51,42%) do grupo D. No momento 24, 54 animais foram positivos, sendo 13 (44,82%) do grupo B, 10 (52,63%) do grupo C e 31 (96,9%) do grupo D.

Dez leitões apresentaram títulos maiores que 25 (RIFI) na saliva para *N. caninum* no momento 24 horas após o nascimento, sendo um leitão proveniente da fêmea 4 (grupo B), dois leitões descendentes da fêmea 10 (grupo C) e sete pertenciam ao grupo D: dois apresentando título 25, três apresentando título 50 e dois apresentando título 100. Para justificar isso, pode-se correlacionar a titulação encontrada na saliva com a encontrada no colostro e no líquido amniótico, com isso percebe-se que as fêmeas do grupo D apresentaram altos títulos de anticorpos no colostro e no líquido amniótico, a fêmea 4, apresentou maiores títulos no leite, entre os animais do grupo B, e o animal 10, apresentou maiores títulos no leite e no líquido amniótico, entre todos os animais inoculados.

Tabela 7 - Detecção de anticorpos IgG contra *Neospora caninum*, no soro e plasma, ao nascimento (pré-colostral) e 24 horas após, em leitões descendentes de fêmeas suínas inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*, correlacionando com a titulação de IgG contra *Neospora caninum* no leite materno no momento do parto.

	Marrã	Nº leitões	Momento 0			Momento 24		Titulação leite
			Soro	Plasma	% Positivo	Soro	% Positivo	
					Total		Total	
Grupo A	14	11	0	0	0	0	0	0
	15	12	0	0	0	0	0	0
	16	9	0	0	0	0	0	0
	Total	32	0	0	0	0	0	
Grupo B	1	13	0	0	0	13	100	800
	3	9	0	0	0	6	85,71	400
	4	13	0	0	0	8	88,9	3200
	Total	35	0	0	0	27	93,1	
Grupo C	8	10	0	0	0	6	100	12800
	9	10	0	0	0	8	100	1600
	10	4	2	2	50	4	100	409600
	Total	24	2	2	8,33	18	100	
Grupo D	11	10	3	2	30	10	100	25600
	12	10	8	10	100	10	100	25600
	13	15	3	3	26,7	12	100	51200
	Total	35	14	15	48,57	32	100	----

Nº: Número; %: percentagem

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

b) IgM

Apenas um leitão, pertencente ao grupo D, apresentou resultado positivo para IgM quando analisado o soro no momento 0. Já quando analisado o plasma, dois leitões do grupo D foram positivos.

Já, no momento 24, 42 leitões apresentaram anticorpos IgM no soro, sendo 16 (55,17%) do grupo B, 13 (68,42%) do grupo C e 13 (41,93%) do grupo D.

Todos os animais positivos no plasma e soro apresentaram título de 50 para anticorpos IgM.

Quando avaliada a presença de IgM na saliva, pode-se observar que apenas quatro animais foram positivos no momento 0, sendo todos eles provenientes da marrã 1,

pertencente ao grupo B. Já, no momento 24, todos os leitões foram negativos quando avaliado IgM na saliva.

6.4.3 PCR para detecção de *N. caninum*

Três marrãs, das nove inoculadas, apresentaram resultado positivo na PCR do leite, para a detecção de DNA de *N. caninum*, sendo uma de cada grupo inoculado. No líquido amniótico, cinco, apresentaram resultados positivos na PCR, sendo uma do grupo B, duas do grupo C e duas do grupo D.

Cinco fêmeas apresentaram resultado positivo para *N. caninum* na PCR da placenta, sendo uma do grupo B (4), uma do grupo C (10) e as três do grupo D.

Dos 24 fetos mumificados, nove (37,5%) foram positivos na PCR para *N. caninum*, sendo um (11,1%) feto do grupo B, sete (77,8%) do grupo C, e um (11,1%) do grupo D (Tabela 8). O órgão analisado, nos fetos mumificados, que apresentou maior positividade para *N. caninum* foi o cérebro (37,5%).

Dos leitões nascidos, provenientes de fêmeas inoculadas com *N. caninum*, quando analisados cérebro, coração, fígado, diafragma, pulmão, sangue e saliva nos momentos 0 e 24, verificou-se que 93,61% (88/94) foram positivos na PCR. Todas as marrãs inoculadas deram origem a pelo menos um leitão positivo (Tabela 8).

Apenas dois leitões dos 94, provenientes das marrãs inoculadas apresentaram resultado negativo tanto na sorologia como na PCR, sendo um leitão proveniente do grupo B (marrã 4) e outro do grupo C (marrã 8).

Pela PCR, a saliva, no momento 24, foi a que apresentou maior número de leitões positivos (51:80) para o protozoário, seguido da saliva no momento 0 (47:94), coração (45:94), cérebro (42:94), sangue (41:94), fígado (35:94), pulmão (33:94) e diafragma (30:94).

Todos os leitões nascidos com má formação fetal, provenientes das fêmeas inoculadas com o protozoário, foram positivos, em pelo menos um dos órgãos avaliados, na PCR.

Tabela 8 - Detecção de *Neospora caninum* em tecidos e fluídos de leitões descendentes de fêmeas suínas inoculadas, ou não, com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum*

Grupo	Porca	nº leitões	Cérebro		Coração		Fígado		Diafrag		Pulmão		Sangue		Saliva 0		Saliva 24		Positivo	
			P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
A	14	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	1	13	5	38,46	7	53,84	4	30,76	0	0	0	0	5	38,46	6	46,15	6	46,15	13	100
	3	9	1	11,11	0	0	1	11,11	1	11,11	1	11,11	1	11,11	5	55,55	6	66,66	8	88,9
	4	13	5	38,46	6	46,15	1	7,7	0	0	1	7,7	7	53,84	2	15,38	8	61,53	10	77
	T	35	11	31,42	13	37,14	6	17,14	1	2,85	2	5,71	13	37,14	13	37,14	20	57,14	31	88,57
C	8	10	1	10	3	30	3	30	0	0	0	0	5	50	1	10	1	10	8	80
	9	10	1	10	7	70	1	10	2	20	0	0	6	60	0	0	3	30	10	100
	10	4	4	100	2	50	3	75	4	100	4	100	2	50	2	50	2	50	4	100
	T	24	6	25	12	48	7	29,16	6	25	4	16,66	13	54,16	3	12,5	6	25	22	91,67
D	11	10	8	80	6	60	9	90	9	90	9	90	3	30	9	90	9	90	10	100
	12	10	9	90	7	70	5	50	6	60	9	90	6	60	9	90	8	80	10	100
	13	15	8	53,33	7	46,67	8	53,33	8	53,33	9	60	6	40	13	86,66	8	53,33	15	100
	T	35	25	71,43	20	57,14	22	62,85	23	65,71	27	77,14	15	42,85	31	88,57	25	71,42	35	100

P: positivo; N°: número; %: percentagem; Diafrag.: Diafragma; T: total

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

6.4.4 Coeficiente de concordância de Kappa

Foi utilizado para comparar os resultados encontrados, na sorologia (IgM e IgG) e na PCR, dos diferentes tecidos e fluidos dos leitões.

Houve concordância quase perfeita (0,82; IC 0,67-0,97) quando analisados os resultados do soro e do plasma, no momento 0, para a pesquisa de IgG contra *N. caninum*. Já quando analisado IgG na saliva e no soro, no momento 24, houve concordância moderada (0,48; IC 0,31-0,66). Concordância razoável foi observada quando analisados soro (IgG) e saliva (0,34; IC 0,14-0,55), e plasma (IgG) e saliva (IgG) (0,28; IC 0,07-0,49), ambos no momento 0.

A pesquisa da imunoglobulina M, quando comparados os resultados nos diferentes fluidos, resultou numa concordância insignificante (>0) em todas as amostras.

Já, quando comparados os resultados da PCR nos tecidos e fluidos, teve-se como resultado (Tabela 9):

- concordância forte entre diafragma e pulmão (0,72; IC 0,58-0,86) e pulmão e fígado (0,63; IC 0,48-0,79);
- concordância moderada entre cérebro e pulmão (0,60; IC 0,45-0,75), fígado e diafragma (0,56; IC 0,40-0,73), pulmão e saliva 0 (0,53; IC 0,37-0,68), cérebro e diafragma (0,50; IC 0,33-0,66), diafragma e saliva 0 (0,43; IC 0,26-0,60) e entre cérebro e fígado (0,42; IC 0,25-0,59);
- concordância razoável entre pulmão e saliva 24 (0,40; IC 0,23-0,57), fígado e saliva 0 (0,39; IC 0,21-0,56), coração e diafragma (0,38; IC 0,20-0,56); diafragma e saliva 24 (0,38; IC 0,20-0,56), coração e sangue (0,36; IC 0,19-0,53), cérebro e saliva 0 (0,35; IC 0,18-0,52), cérebro e saliva 24 (0,34; IC 0,16-0,50), coração e saliva 24 (0,32; IC 0,15-0,49), cérebro e coração (0,31; IC 0,14-0,48), fígado e saliva 24 (0,30; IC 0,12-0,48), saliva 0 e saliva 24 (0,29; IC 0,12-0,46), coração e fígado (0,27; IC 0,09-0,45) e cérebro e sangue (0,22; IC 0,05-0,40);
- concordância fraca entre pulmão e sangue (0,20; IC 0,01-0,38), sangue e saliva 24 (0,18; IC 0,004-0,36), sangue e saliva 0 (0,13; IC 0,04-0,30), diafragma e sangue

(0,12; IC 0,06-0,31), fígado e sangue (0,09; IC 0,08-0,27) e coração e saliva 0 (0,07; IC 0,03-0,25).

Tabela 9 – Coeficiente Kappa para resultados de PCR obtidos de tecidos e fluidos de leitões descendentes de porcas inoculadas e não inoculadas com $2,9 \times 10^7$ taquizoítos da cepa Nc1 de *Neospora caninum*

	SNC	Coração	Fígado	Diafragma	pulmão	sangue	saliva 0	Total positivos
SNC	-	-	-	-	-	-	-	42
coração	0,32	-	-	-	-	-	-	45
fígado	0,42	0,27 (0,09-0,45)	-	-	-	-	-	35
diafragma	0,50 (0,33-0,66)	0,38	0,56 (0,40-0,73)	-	-	-	-	30
pulmão	0,60 (0,45-0,75)	0,34	0,64 (0,48-0,79)	0,73 (0,58-0,86)	-	-	-	33
sangue	0,23	0,37	0,10	0,32	0,19	-	-	41
saliva 0	0,36	0,08	0,39	0,44	0,53 (0,37-0,68)	0,13 (0,04-0,30)	-	47
saliva 24	0,34	0,33	0,31	0,38	0,40	0,18 (0,004-0,36)	0,30 (0,12-0,46)	51

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

6.4.5 Bioensaio em cães

Os três cães que ingeriram placenta e SNC, não eliminaram oocistos de *N. caninum* e não soroconverteram durante todo o experimento.

6.5 DISCUSSÃO

Todas as marrãs inoculadas soroconverteram (IgG e IgM), demonstrando que a inoculação da cepa Nc1 de *N. caninum* foi efetiva. Esses resultados condizem com os encontrados por Dubey et al. (1996), que inocularam $2,5 \times 10^6$ taquizoítos da cepa Nc1 de *N. caninum* em suínos para testar as técnicas de RIFI e ELISA.

Os títulos de anticorpos IgM encontrados nas marrãs inoculadas, no decorrer da gestação, sugerem que houve reativação da infecção pelo *N. caninum* nas fêmeas do

grupo B (inoculadas aos 30 dias antes da concepção), aproximadamente no 100 DPI, correspondendo a aproximadamente 70 dias de gestação.

Imunoglobulinas da classe M estão associadas com a fase aguda, sendo detectadas apenas no começo da infecção ou após reinfecção ou reativação. Em bovinos a principal forma de transmissão vertical do *N. caninum* é via endógena, ou seja, devido a ação de determinados hormônios e a imunossupressão na gestação, o cisto do protozoário, que estava alojado em determinado tecido se rompe, liberando bradizoítos, que se convertem em taquizoítos e migram para diversos órgãos do corpo, incluindo a placenta e atingindo o feto. Dependendo da fase da gestação em que isso acontece, pode ocorrer ou não a morte fetal (MCALLISTER, 2016). Com base nisso, sugerimos que a transmissão transplacentária do *N. caninum*, nas fêmeas do grupo B, tenha acontecido aproximadamente nos 70 dias de gestação, devido a presença de anticorpos da classe IgM nas marrãs e a presença de DNA do protozoário nos tecidos dos leitões.

Ainda, em bovinos, quando ocorre a transmissão endógena, essa é mais comum acontecer entre os segundo e terceiro terços gestacionais, devido a ações hormonais e imunológicas (ANTONELLO et al., 2015). Portanto, podemos afirmar que a patogenia da transmissão endógena do *N. caninum* em suínos é similar à de bovinos.

Nenhuma das fêmeas apresentou aborto, porém houve um grande número de fetos mumificados. Atualmente, é considerada aceitável uma taxa de 1,0-3,4% de mumificados em granjas de suínos no Brasil, sem estar associada com agentes infecciosos, apenas pelo aumento no número de fetos por porca (Bortolanza et al., 2017).

Duas marrãs do grupo controle tiveram oito fetos mumificados, sendo quatro cada uma, fato este justificado pelo estresse da contenção durante a coleta de sangue. A fêmea número 14, que apresentou quatro leitões mumificados, sendo que três desses apresentaram morte fetal próximo aos 47 dias de gestação, era muito agitada e estressada, sendo a coleta de sangue, que começou no dia 42 de gestação, muito dificultosa. Diversas são as causas de morte fetal não infecciosas, as principais são estresse, temperaturas extremas, substâncias tóxicas, queimaduras solares, entre outras (SOBESTYANSKY et al., 2007).

Quando observados os fetos mumificados descendentes de fêmeas infectadas, no grupo B, apenas um feto foi positivo (PCR) para *N. caninum*, cuja morte fetal

provavelmente ocorreu aproximadamente aos 57 dias de gestação, ou seja, no 87 DPI, resultado esse que coincide com os resultados de detecção de IgM encontrados no soro das porcas.

As porcas do grupo C apresentaram sete dos nove fetos mumificados positivos para *N. caninum* (PCR), sendo que todos os fetos mumificados da marrã 10 foram positivos para o protozoário. Pela estimativa da idade fetal em que ocorreu a morte, pode-se perceber que todos os positivos, com exceção de um, morreram após a inoculação. Apenas um feto, dos três mumificados do grupo D, apresentou resultado positivo para *N. caninum*, porém a idade gestacional em que ocorreu a morte fetal não coincide com a inoculação do protozoário na marrã. Entretanto, vale salientar que é apenas uma estimativa, pois os tamanhos dos leitões podem variar durante a gestação e no momento do nascimento, portanto, esse leitão se não sofresse morte fetal, poderia ter nascido com um peso menor comparado com outros leitões da mesma marrã (refugo).

Alguns fetos mumificados oriundos das fêmeas inoculadas tiveram resultado negativo na PCR para o protozoário (7:16). Esse fato, não descarta a possibilidade desses fetos terem sido infectados com *N. caninum*, pois resultados falso-negativos, decorrentes do processo de mumificação que pode ter degradado o DNA, podem ocorrer (SNAK et al., 2018).

Esses resultados demonstram que há transmissão transplacentária do *N. caninum* em suínos, podendo ainda esse ser uma das causas de mumificação fetal nessa espécie animal. Ainda, a mumificação fetal causada pelo *N. caninum* em suínos, tende a ocorrer com maior frequência em fêmeas infectadas no segundo terço da gestação (45 dias). Resultados que condizem com a espécie bovina, na qual é mais comum ocorrer morte fetal entre os primeiro e segundo terços gestacionais (MCALLISTER, 2016; CAMILLO et al., 2010).

Ainda, em bovinos, raramente ocorre morte fetal quando o animal é infectado no terço final de gestação (CAMILLO et al., 2010), resultado esse também observado no presente experimento, onde as marrãs inoculadas com 90 dias de gestação e 30 dias antes da concepção (reativação no 70 dias de gestação) tiveram baixa taxa de morte fetal, porém com o nascimento de leitões positivos (IgG/IgM/PCR).

Corroborando com esse estudo, onde foi associado a infecção do *N. caninum* com problemas reprodutivos em suínos, Kamga-Waladjo et al. (2009) analisaram 60 amostras de soro de fêmeas de suínos errantes na região do Senegal e encontraram 58,3% das amostras positivas para *N. caninum* e associaram ($p < 0,05$) a natimortalidade com a soropositividade para *N. caninum*, demonstrando que o protozoário pode causar problemas reprodutivos em suínos.

Ainda, Jensen et al. (1998) inocularam, via intramuscular, seis marrãs com $2,5 \times 10^6$ taquizoítos da cepa NC-SweB1 de *N. caninum* com objetivo de verificar a transmissão transplacentária do parasito. Porém, essas marrãs foram eutanasiadas antes do parto, não sendo possível verificar as possíveis complicações reprodutivas. Todas as marrãs soroconverteram e foi possível detectar, por meio de imunohistoquímica, o protozoário em três fetos (3:64), sendo esse um indicativo da transmissão transplacentária.

Portanto, o presente trabalho é o primeiro estudo cujos resultados permitem associar a infecção por *N. caninum* com a morte fetal em suínos.

Quando analisados, peso e tamanho do leitão e tamanho da leitegada e peso das placentas, não houve diferença estatística, sugerindo que *N. caninum* não interfere no tamanho da leitegada, tamanho, peso e sexo dos leitões e no peso das placentas.

Quando analisados sorologicamente (IgG) os leitões nascidos vivos, no momento 0, percebe-se que apenas os leitões do grupo D, e dois leitões provenientes da porca 10 do grupo C, apresentaram anticorpos pré-colostral contra o protozoário. A placenta da espécie suína é do tipo epiteliocorial, onde não há contato entre sangues materno e fetal (SINKORA e BUTHER, 2016), portanto, não há passagem de anticorpos da mãe para o leitão, sendo esses anticorpos encontrados gerados pelos leitões como resultado da infecção. Já quando avaliados anticorpos IgM, no soro/plasma dos leitões no momento do nascimento, apenas três animais apresentaram resultado positivo. O desenvolvimento de anticorpos fetais em suínos começa a acontecer com aproximadamente 45 e 58 dias de gestação para IgM e para IgG, respectivamente, porém apesar de ocorrer produção de anticorpos, essa é muito pequena (SINKORA e BUTHER, 2016), justificando, portanto, a baixa titulação observada na sorologia.

Quando avaliado o soro no momento 24, grande parte dos leitões descendentes de fêmeas inoculadas com *N. caninum*, apresentaram resultados positivos para IgG (96,2%) e IgM (52,5%), demonstrando que as fêmeas foram capazes de passar anticorpos via colostro.

Comparando-se os títulos de anticorpos IgG presentes no leite com a soroconversão dos leitões, pode-se perceber que as fêmeas que apresentaram altos títulos de anticorpos eram dos grupos que apresentaram mais leitões positivos no momento 24 horas (pós-colostal). Quando comparado os títulos de anticorpos do leite com os títulos de anticorpos dos leitões no momento 24 horas, nota-se que quanto maior o título de anticorpos do leite, maior foram os títulos de anticorpos dos leitões.

As fêmeas do grupo B apresentaram menores títulos de anticorpos no leite, menor soroconversão dos leitões e menores títulos de anticorpos nos leitões após 24 horas.

Ainda, quando analisada a saliva dos leitões ao nascimento e 24 horas após, percebe-se que quanto mais tarde foi a inoculação, maior foi o número de leitões positivos nos dois momentos. No momento do nascimento pode-se dizer que a saliva dos leitões é basicamente constituída pelo líquido amniótico, e quanto maior o título de anticorpos neste, maior foi o número de leitões positivos no momento do nascimento. Assim como, quanto maior os títulos de anticorpos no leite, maior foi o número de leitões positivos, pela saliva, 24 horas após o nascimento.

Houve um maior número de leitões positivos (IgG) para *N. caninum* na saliva quando comparados os resultados com soro e plasma, no momento 0. Anticorpos contra o protozoário já foram detectados na saliva de bovinos (Ooi et al., 2000), portanto, a saliva pode ser utilizada como uma alternativa para o diagnóstico sorológico de *N. caninum*.

Os resultados da PCR demonstram que as nove fêmeas inoculadas com *N. caninum* foram capazes de transmitir o protozoário para os leitões. Apenas seis leitões apresentaram resultado negativo (PCR) em todos os órgãos e fluidos, porém resultados falso-negativos podem ocorrer, pois quatro dos seis leitões negativos na PCR apresentavam anticorpos (IgM e/ou IgG) contra o protozoário.

Além da transmissão transplacentária em suínos, há chance de ocorrer transmissão através do leite e do líquido amniótico, pois foi encontrado DNA do parasito

nesses fluídos. *N. caninum* já foi detectado no leite e no líquido amniótico de bovinos (RAZMI e BARATI, 2017; HO et al., 1997), porém em suínos esse é o primeiro relato na literatura.

A placenta é um órgão importante que deve ser avaliado, quando possível, para estudar as causas do aborto e, em se tratando em *N. caninum*, é um dos tecidos com maior positividade quando avaliado pelas técnicas da PCR e isolamento (COSTA et al., 2018; SINTOTT et al., 2017; MCALLISTER, 2016). Nesse estudo, foi possível detectar a presença de DNA do protozoário em placenta de cinco, das nove porcas inoculadas, corroborando com outros trabalhos desenvolvidos em outras espécies de animais (SNAK et al., 2018; COSTA et al., 2018).

Quando analisados os órgãos e fluidos dos leitões por meio da PCR, o que apresentou maior positividade foi a saliva no momento 24, seguida da saliva no momento 0. Essa é a primeira detecção do DNA de *N. caninum* em saliva de animais. Esse fato pode ser justificado, pela presença de DNA do protozoário no leite e no líquido amniótico, podendo então estar presente na saliva dos leitões. Portanto, com esses resultados podemos sugerir a utilização de saliva de leitões para o diagnóstico de neosporose nas granjas.

Pode-se, também, utilizar capa leucocitária para diagnóstico, por meio da PCR, da infecção por *N. caninum* em animais. Nesse estudo, foram encontrados resultados satisfatórios utilizando esse tipo de amostra, porém, há grande dificuldade na coleta de sangue em leitões recém-nascidos.

Dentre os órgãos avaliados, os que apresentaram maior positividade (PCR) foi o coração, seguido do cérebro, fígado, pulmão e diafragma (Tabela 9). Esses resultados condizem com os encontrados em bovinos, onde o SNC é o principal órgão para detecção do protozoário, seguido do coração (SNAK et al., 2018; SINOTT et al., 2017; MCALLISTER, 2016, AMARAL et al., 2012).

A análise do coeficiente de concordância de Kappa, demonstrou que, apesar da saliva (0 e 24) apresentar um maior número de leitões positivos, os resultados não concordam plenamente com os demais órgãos, ou seja, não foram, necessariamente, os mesmos animais que apresentam resultados positivos na saliva 24 e cérebro, por exemplo. Portanto, há a necessidade de avaliar dois ou mais órgãos/fluidos para obter

resultados mais exatos da positividade dos animais. Porém, houve uma forte concordância entre pulmão e diafragma e entre pulmão e fígado, demonstrando que esses órgãos apresentam resultados similares, podendo então, selecionar apenas um deles para um efetivo diagnóstico.

Por fim, o bioensaio em cães foi realizado para verificar a viabilidade dos bradizoítos e taquizoítos presentes na placenta e no SNC dos leitões. Nenhum dos cães soroconverteu ou eliminou oocistos dos protozoários, demonstrando que não houve transmissão de *N. caninum* de tecidos fetais de suínos para o hospedeiro definitivo. Contudo, o isolamento de *N. caninum* em cães é difícil de ser realizado. Diversos estudos de inoculação experimental do protozoário em cães não apresentaram sucesso, com os cães raramente eliminando oocistos ou soroconvertendo (CEDILLO et al., 2008). Apesar de ainda não estar totalmente claro, acredita-se que diversos são os fatores que podem interferir na infecção do cão e, conseqüentemente, na eliminação dos oocistos, como temperatura de armazenamento do tecido contendo os bradizoítos, quantidade de taquizoítos e bradizoítos no tecido animal e idade dos cães (CEDILLO et al., 2008).

6.6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a infecção por *Neospora caninum* em suínos pode ser transmitida via transplacentária e causar desordens reprodutivas, como fetos mumificados, principalmente nos primeiro e segundo terços gestacionais. Transmissão vertical endógena foi observada nas porcas inoculadas no terço final da gestação, por reativação da infecção.

Ainda, pode-se observar que os principais órgão e fluidos para detecção de *N. caninum* em leitões congenitamente infectados são saliva, cérebro, coração e sangue.

6.7 REFERENCIAS

Amaral, R.L.G., Silva, L.B.G., Pinheiro Júnior, J.W., Souza Neto, O.L., Leal, C.A.S., Porto, W.J.N., Barbosa, J.M.P., Mota, R.A., 2012. *Neospora caninum* em bovinos em matadouros de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.*, 32, 963-966.

- Antonello, A.M., Camillo, G., Weber, A., Braunig, P., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., 2015. Dinâmica sorológica de anticorpos contra *Neospora caninum* durante a gestação de vacas naturalmente infectadas. *Cienc. Anim. Bras.*, 16, 553-559.
- Azevedo, S.S., Pena, H.F.J., Alves, C.J., Guimaraes Filho, A.A.M., Oliveira, R.M., Maksimov, P., Shares, G., Gennari, S.M., 2010. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 19, 80-84.
- Bartova, E., Sedlak, K., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic. *Parasitol.*, 138, 1369-1371.
- Basso, W., Handke, M., Sydler, T., Borel, N., Grimm, F., Sidler, X., Deplazes, P., 2015. Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. *Parasitol. Int.*, 64, 157-160.
- Bortoletto, C., Ferreira, G.F., Gasser, B., Nakamura, A.M., Almeida, H.M.S., Oliveira, L.G., 2014. Main causes of reproduction disorders in sows. *Rev. Cient. Med. Vet.*, 23, 1-22.
- Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S., Thompson, K.M., Rae, A.G., Innes, E.A., 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.*, 118, 267-279.
- Camillo, G., Cadore, G., Cezar, A.S., Toscan, G., Bräunig, P., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., 2010. Antibodies to *Neospora caninum* in dairy cattle in Southwest of Paraná State. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62, 1511-1513.
- Cantón, G.J., Katzer, F., Maley, S.W., Bartley, P.M., Benavidessilván, J., Palarea-Albaladejo, J., Pang, Y., Smith, S.H., Rocchi, M.S., Buxton, D., Innes, E.A., Chianini, F., 2014. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. *Vet. Res.*, 45, 1-5.
- Cavalcante, G.T., 2010. Thesis. Infecção experimental por *Neospora caninum* em cães (*Canis familiaris*) jovens, adultos e gestantes. Doutorado em Ciências – Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Cedillo, C.J.R., Martínez, M.J.J., Santacruz, A.M., Banda, R.V.M., Morales, S.E., 2008. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 154, 151-155.
- Cerqueira-Cezar, C.K., Pedersen, K., Calero-Bernal, R., Kwok, O.C., Villena, I., Dubey, J.P., 2016. Seroprevalence of *Neospora caninum* in feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. *Vet. Parasitol.*, 226, 35-37.
- Costa, R.C., Mesquita, L.P., Nunes, M.V.L., Oliveira, I.M., Oliveira, L.F.S., Souza, A.R., Maiorka, P.C., Varaschin, M.S., 2018. *Neospora caninum* bioassay in gerbils using placental tissues naturally infected goats. *Vet. Parasitol.*, 249, 70-73.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, D.S., Gay, J.M., Baszler, T.V., Blagburn, B.L., Thulliez, P., 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 57, 329-336.
- Feitosa, T.F., Vilela, V.L.R., Melo, L.R.B., Almeida Neto, J.L., Souto, D.V.O., Morais, D.F., Athayde, A.C.R., Azevedo, S.S., Pena, H.F.J., 2014. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 202, 305-309.
- Helmick, B., Otter, A., Mcgarra, J., Buxton, D., 2002. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Res. Vet. Sci.*, 73, 187-189.
- Ho, M.S.Y.; Barr, B.C.; Rowe, J.D.; Anderson, M.L.; Sverlow, K.W.; Packham, K.W.; Marsh, A.E.; Conrad, P.A., 1997. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J. Parasitol.* 83, 508-514.
- Jensen, L., Jensen, T.K., Lind, P., Henriksen, S.A., Uggla, A., Bille-Hansen, V., 1998. Experimental porcine neosporosis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 106, 475-482.
- Kamga-Waladjo, A.R., Chatagnon, G., Bakou, S.N., Boly, H., Diop, P.E.H., Tainturier, D., 2009. *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive characteristics in wandering sows from Senegal, West Africa. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 4, 263-266.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical. *Biometrics*, 33, 159-174.

- Lopes, M.G., Solorio, M.R., Soares, H.S., Schares, G., Hartley, A.Z., Alcázar, P., Ferreira, F., Camargo, M.C.G.O., Gregori, F., Gennari, S.M., 2018. *Neospora caninum*-specific antibodies in free-ranging white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the peruvian amazon: detection of antibodies in serum and evaluation of indirect fluorescent antibody test with heterologous secondary antibody. J. Zoo. Wildl. Med. 49, 656-661.
- Mcallister, M.M., 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 32, 443-463.
- Muller, N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottstein, B., 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. J. Clin. Microbiol., 34, 2850–2852.
- Ooi, H.K., Huang, C.C., Yang, C.H., Lee, S.H., 2000. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. Vet. Parasitol., 90, 47-55.
- Padilha, J.B., Groff, P.M., Turmina, R., Teixeira, P.P.M., 2017. Mortalidade embrionária e fetal em suínos: uma revisão. Nucleus Animalium, 9, 7-16.
- Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 7, 273-275.
- Pescador, C.A., Bandarra, P.M., Antoniassi, N.A.B., Santos, A.S., Oliveira, E.C., Barcellos, D.E.S.N., Driemeier, D., 2010. Metodologia aplicada na avaliação de fetos suínos abortados e natimortos. Pesq. Vet. Bras., 30, 1058-1063.
- Razmi, G., Barati, M., 2017. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in bulk milk dairy cattle, Mashhad, Iran. Arch. Razi. Inst. 72, 265-269.
- Sharma, R.N., Tiwari, K., Chikweto, A., Deallie, C., Bhaiyat, M.I., 2015. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in pigs in Grenada, West Indies. Open J. Vet. Med., 5, 138-141.
- Sheather, A.L., 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. J. Com. Pathol., 36, 266-275.

SILVA, M.O., 2017. Thesis. Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em matrizes suínas de rebanhos comerciais no estado de Santa Catarina. Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

Sinkora, M., Butler, J.E., 2016. Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes. Dev. Comp. Immunol., 58, 1-17.

Sinnott, F.A., Monte, L.G., Collares, T.F., Silveira, R.M., Borsuk, S., 2017. Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). Vet. Parasitol., 239, 19-25.

Snak, A., Garcia, F.G., Lara, A.A., Pena, H.F.J., Osaki, S.C., 2018. *Neospora caninum* in properties in the West region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. Braz. J. Vet. Parasitol., 27, 51-59.

Soares, H.S., Ramos, V.N., Osava, C.F., Oliveira, S., Szabó, M.P.J., Piovezan, U., Castro, B.B., Gennari, S.M., 2016. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in wild pigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 53, 112-116.

Sobestiansky, J., Barcellos, D., 2007. Doenças de Suínos. Goiania: Canone Editorial, 770p.

7 ANEXOS

ANEXO 01

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Meio de cultivo RPMI (500 ml)

- 1g de bicarbonato de sódio
- 5,2g de meio RPMI
- 0,011g de Piruvato
- Antibiótico (500µl de penicilina/estreptomicina)
- Fungicida (500µl de anfotericina B)
- 250µl de vermelho de fenol
- Completar 500ml de água ultrapura (MiliQ)
- Filtrar com filtro 0,22µm

Meio de cultivo RPMI + SFB (10%)

- 90ml meio de cultivo RPMI
- 10ml SFB

Meio de cultivo RPMI + SFB (20%)

- 80ml meio de cultivo RPMI
- 20ml SFB

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Descongelamento de células VERO

- Retirar do congelamento microtubo contendo as células VERO
- Colocar o microtubo em banho-maria (37°C) até descongelamento
- Preparar uma garrafa para cultivo celular com 5ml de Meio RPMI + SFB (20%)
- Homogeneizar todo o conteúdo do microtubo e transferir para a garrafa
- Incubar em estufa de CO₂ a 37°C
- 24 horas após, trocar meio de cultura, com concentração 10% de SFB
 - Homogeneizar bem o conteúdo da garrafa
 - Descartar todo o conteúdo
 - Colocar 5ml de meio RPMI + SFB (10%)
- Observar diariamente a formação e desenvolvimento do tapete celular
- Trocar diariamente o meio, utilizando meio RPMI sem SFB ou com 10% de SFB

OBS: A concentração de SFB é diretamente proporcional ao crescimento celular

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Passagem de células VERO

- Utilizar uma garrafa com células confluentes (formação de um grande tapete celular)
- Homogeneizar o meio de cultura e descartá-lo
- Adicionar 1ml de tripsina sob o tapete celular
- Homogeneizar durante 30 segundos e descartá-lo
- Adicionar 1,5ml de tripsina
- Incubar a 37°C por 5 minutos
- Adicionar 1,5ml de meio RPMI (com ou sem SFB)
- Pipetar sucessivamente a solução (tripsina+RPMI) sobre o tapete até total desprendimento. Também, com a garrafa fechada pode bate-la contra a mão para ajudar no desprendimento
- Passar o conteúdo dessa garrafa para outras 2 ou 3 garrafas
- Acrescentar 5ml de meio RPMI sem SFB ou com 10% de SFB em cada garrafa
- Incubar em estufa de CO₂ a 37°C
- Observar diariamente a formação e desenvolvimento do tapete celular
- Trocar diariamente o meio, utilizando meio RPMI sem SFB ou com 10% de SFB

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Descongelamento de *Neospora caninum*

- Retirar do congelamento um microtubo com *N. caninum*
- Colocar o microtubo em banho-maria a 37°C até total descongelamento
- Preparar o tubo “tipo Falcon” com 3ml de SFB
- Homogeneizar todo o conteúdo do microtubo e transferir para o tubo “tipo Falcon”
- Centrifugar 1500rpm por 10min
- Descartar o sobrenadante
- Adicionar 1,3ml de meio RPMI
- Adicionar 300µl (0,3ml) de SFB
- Transferir todo o conteúdo do tubo “tipo Falcon” para uma garrafa com células VERO confluentes (formação de um grande tapete celular)
- Acrescentar 4ml de meio RPMI + SFB (20%)
- Incubar em estufa de CO₂ a 37°C
- Trocar o meio de cultura diariamente, utilizando meio RPMI + SFB (20%) durante os 2 primeiros dias
- No terceiro dia após o descongelamento utilizar meio RPMI sem SFB

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Passagem de *N. caninum* em cultivo celular

- Utilizar uma garrafa repleta de taquizoítos com 50 a 90% do tapete celular destruído
- Pipetar sucessivas vezes o meio de cultura até total desprendimento do tapete celular, liberando uma maior quantidade de taquizoítos
- Passar o conteúdo homogeneizado para 2 ou 3 garrafas de células VERO confluentes (formação de um grande tapete celular) sem meio de cultura
- Adicionar 5ml de meio RPMI sem SFB em cada garrafa
- Incubar em estufa de CO₂ a 37°C

Trocar o meio (RPMI sem SFB) diariamente e observar a destruição do tapete celular

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Congelamento de células VERO

- Utilizar uma garrafa de cultivo células VERO confluentes (formação de um grande tapete celular), sem porções destruídas ou células mortas
- Retirar todo o meio de cultura da garrafa
- Pipetar 1ml de Tripsina e homogeneizar durante 30 segundos
- Retirar a Tripsina
- Adicionar 1ml de Tripsina
- Incubar a 37°C por 2 minutos
- Pipetar sucessivamente a Tripsina sobre o tapete celular até total desprendimento. Também, com a garrafa fechada pode bate-la contra a mão para ajudar no desprendimento
- Adicionar 4,5ml de meio de cultura RPMI com SFB (10%)
- Homogeneizar o conteúdo na garrafa
- Transferir todo o conteúdo para um tubo “tipo Falcon”
- Centrifugar a 1500rpm por 10 minutos
- Preparar o meio de congelamento, contendo: 40% (400µl) de meio RPMI, 50% (500µl) de SFB e 10% (100µl) de DMSO
- Ao final da centrifugação desprezar sobrenadante
- Ressuspender o pellet com o meio de congelamento
- Colocar o conteúdo em um criotubo, preenchendo no máximo 2/3
- Envolver o criotubo com algodão e colocar em freezer -20°C por 1 hora
- Colocar em freezer -80°C por um dia e após em nitrogênio líquido

PROTOCOLO CULTIVO CELULAR

Congelamento de *N. caninum*

- Utilizar uma garrafa de cultivo repleta de taquizoítos com 50 a 90% do tapete celular destruído (taquizoítos se movendo)
- Pipetar sucessivamente o meio de cultura, ressuspensando todo o conteúdo da garrafa para total desprendimento do tapete celular
- Passar todo o conteúdo da garrafa para um tubo “tipo Falcon”
- Centrifugar a 1500rpm por 10 min
- Preparar meio de cultivo para congelamento

RPMI	SFB	DMSO	Volume Final
8,5ml	1,0ml	0,5ml	10ml
4,25ml	0,5ml	0,25ml	5ml
2,12ml	0,25ml	0,12ml	2,5ml

- Desprezar o sobrenadante
- Ressuspender o pellet com 1,3ml do meio de cultivo para congelamento
- Passar para um criotubo
- Manter em temperatura ambiente por 30min
- Envolver o criotubo com algodão
- Armazenar em freezer a -20°C por 2 horas
- Armazenar em freezer a -80°C por um dia (ainda com o algodão)
- Armazenar em nitrogênio líquido (sem o involucro de algodão)

ANEXO 02

PROTOCOLO PREPARO INÓCULO – *Neospora caninum*

- Utilizar uma garrafa repleta de taquizoítos com 50 a 90% do tapete celular destruído
- Pipetar sucessivas vezes o meio de cultura até total desprendimento do tapete celular, liberando uma maior quantidade de taquizoítos
- Passar todo o conteúdo para um tubo “tipo Falcon”
- Deixar em repouso por 30 minutos na geladeira
- Retirar todo o material sobrenadante e passa-lo para outro tubo “tipo Falcon”
- Centrifugar o sobrenadante a 1500rpm por 10 minutos
- Descartar sobrenadante
- Ressuspender com 1ml de PBS (1x) autoclavado
- Contar em câmara de Neubauer espelhada
 - Contar 5 quadrantes (hemácias)
 - Multiplicar resultado por 50 – resultado em taquizoítos/ μ l
 - Multiplicar resultado por 1000 – resultado em taquizoítos/ml
- Diluir ou concentrar a amostra conforme concentração necessária

ANEXO 03

PROTOCOLO REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)Preparação de Lâminas – antígeno *Neospora caninum*

- Utilizar uma garrafa repleta de taquizoítos com 50 a 90% do tapete celular destruído
- Pipetar sucessivas vezes o meio de cultura até total desprendimento do tapete celular, liberando uma maior quantidade de taquizoítos
- Passar o conteúdo para um tupo “tipo Falcon”
- Deixar em repouso por 30 minutos na geladeira
- Retirar o material sobrenadante e passa-lo para outro tubo “tipo Falcon”, deixando no primeiro tubo cerca de 1ml
- Preencher o tubo com PBS pH 7,2 ou 7,4
- Centrifugar todos os tubos a 1500rpm por 10 minutos e ressuspender pellet com PBS (2X)
- Centrifugar a 1500rpm por 10 minutos
- Descartar o sobrenadante deixando cerca de 2ml no tubo
- Observar em microscópio a quantidade de taquizoítos e células por campo
 - Se houver muitas células o conteúdo pode ser passado por agulha fina (3 a 5 vezes) com o auxílio de uma seringa de 10ml
 - Observar 20 a 30 taquizoítos por campo
- Preencher os halos das lâminas de 5 em 5 lâminas, e após passar recolhendo o excesso de todas as lâminas
- Deixar secar
- Fixar com metanol (5 minutos)
- Deixar secar
- Congelar – freezer -20°C

Glicerina Tamponada

- 9 partes glicerina neutra bidestilada (PA)
- 1 parte de salina tamponada

Colocar a glicerina em um fraco e com a pipeta adicionar o tampão bem no centro da glicerina, soltar lentamente todo o tampão para que ele se difunda na glicerina. Deixar em repouso por pelo menos 24 horas para a completa difusão da solução salina e separação das bolhas

Solução Tampão carbonato/bicarbonato de sódio (para acertar pH)

- Solução 0,5M de carbonato de sódio
 - Dissolver 5,3g de carbonato de sódio anídrico em 100ml de água destilada
 - Solução 0,5M de bicarbonato de sódio
 - Dissolver 4,2g de bicarbonato de sódio em 100ml de água destilada
- Preparar as duas soluções separadas e juntar em partes iguais
- pH deve ser alcalino para se obter a máxima fluorescência

PBS (10x)

- 80g de NaCl
- 2g de KCl
- 2,4g de KH_2PO_4
- 14,4g de Na_2HPO_4 anidro **ou** 27,2g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ **ou** 36,3g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 1000ml de água destilada
- Corrigir pH para 7,2

PBS (1x)

- 900ml água destilada
- 100ml PBS (10x)

RIFI

- Retirar lâminas do freezer para descongelar
- Retirar soro teste e Controles (Positivo e Negativo) para descongelar
- Pipetar PBS (1x) nos microtubos conforme diluição
- Pipetar soro conforme diluição (mínimo 5µl)
- Colocar lâminas identificadas em câmaras úmidas
- Pipetar 12µl soro diluído nas lâminas
- Incubar por 40 minutos a 37°C
- Lavar 2 vezes com PBS (1x)
- Lavar 1 vez com água destilada
- Secar lâmina em estufa a 37°C
- Diluir conjugado com PBS (1x)
- Pipetar 12µl do conjugado diluído nas lâminas
- Incubar por 40 minutos a 37°C
- Lavar 2 vezes com PBS (1x)
- Lavar 1 vez com água destilada
- Secar lâmina em estufa a 37°C
- Pingar 2 gotas de glicerina tamponada
- Colocar lamínula
- Ler em microscópio de epifluorescência

ANEXO 04

PROTOCOLO EXTRAÇÃO DE DNA (Cavalcante, 2010)

- Suspende o tecido em 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS).
- Adicionar 20 µL de proteinase K (20mg/ml).
- Incubar em banho-seco a 56 °C por 2 horas ou à 37 °C overnight.
- Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) e homogeneizar.
- Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos.
- Transferir a fase aquosa para outro tubo (aproximadamente 400 µl).
- Adicionar o mesmo volume de isopropanol absoluto.
- Precipitar por 2 horas ou *overnight*.
- Centrifugar a 12.000 g por 30 minutos.
- Desprezar o sobrenadante por inversão de tubos.
- Ressuspender o sedimento em 1,0 ml de etanol 70% gelado.
- Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos.
- Desprezar o sobrenadante por inversão de tubos.
- Deixar secar em temperatura ambiente.
- Ressuspender o sedimento em 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e homogeneizar.
- Incubar a 56 °C por 10 minutos.
- Centrifugar e armazenar a -20 °C.