

aquáticos. Tais estudos são necessários para o desenvolvimento de qualidade e até mesmo para o melhoramento da produção. Até o presente momento, o Lenaq gerou 17 resumos publicados em cinco diferentes eventos científicos, além de duas dissertações de mestrado. Os resultados também tem sido divulgados em palestras e cursos destinados aos piscicultores e técnicos.

*CNPQ Processo nº 577649/2008-6 (Edital CNPq/Mapa/SDA 064/2008 - Linha 4 - Centros Colaboradores em Defesa Agropecuária).

**Bolsista Técnica CNPq.

¹Polo Regional do Noroeste Paulista, CP 61, CEP 15500-970, Votuporanga, SP, Brasil.

E-mail: tainá_ba@hotmail.com

²Instituto de Pesca, São José do Rio Preto, SP, Brasil. ³Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.

Avaliação do risco de intoxicação humana por Zn, Cu, Mn, Fe pelo consumo de mexilhões de cultivo comercial no estado do Rio de Janeiro

Risk assessment of human contamination by Zn, Cu, Mn, Fe through consumption of farmed mussels from Rio de Janeiro State, Brazil

Lino, A. S.; Galvão, P. M. A.; Longo, R. T. L.; Torres, J. P. M.; Meire, R. O.; Pizzochero, A. C.; Botaro, D.; Malm, O.

Os efluentes domésticos, de indústrias ou de minerações são as principais fontes de metais pesados para os ecossistemas aquáticos, estando principalmente associados ao material particulado em suspensão. Os moluscos bivalves, por serem sedentários e apresentarem hábito alimentar filtrador, se mostram como um bom biomonitor, podendo acumular metais em seus tecidos. A maricultura de mexilhões é o cultivo desses organismos nos seus habitats naturais, geralmente com objetivos comerciais vem crescendo a uma taxa muito elevada. O consumo humano de bivalves com concentrações de metais acima do limite determinado pela World and Health Organization (WHO) pode causar danos à saúde pública. Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Ferro (Fe), apesar de desempenharem funções biológicas, quando ingeridos em altas concentrações, causam sérios riscos à biota e ao homem, podendo, em certos casos, provocar a morte. No Estado do Rio de Janeiro (RJ), o mexilhão *Perna perna* L. é cultivado na Baía de Sepetiba (BS), Baía de Ilha Grande (BIG), Baía de Guanabara (BG) e Arraial do Cabo (AC), possibilitando, assim, um estudo de monitoração que abrange diferentes regiões do RJ. Com o objetivo de verificar se os mexilhões *P. perna* L. cultivados na BS, AC, BG e BIG estavam com concentrações de Zn, Cu, Mn e Fe abaixo do máximo permitido pela WHO para o consumo humano, foram coletados os bivalves dos locais citados acima no final das estações de verão e inverno de 2009. Os metais foram extraídos do tecido dos bivalves adicionando-se uma mistura ácida de HNO₃ + HCl (3:1) e as concentrações determinadas por espectrometria de absorção atômica por chama (AA240FS-Varian) sendo expressas em função do peso úmido (µg/g). Junto ao procedimento de extração e determinação da concentração dos metais nas amostras foi concomitantemente utilizado material certificado de referência (NIST-2976) para fins de controle de qualidade. As concentrações de Zn, Cu, Mn e Fe verificadas nos mexilhões estavam abaixo do limite de ingestão determinado pela WHO (Zn = 300 µg/kg/dia; Cu = 10 µg/kg/dia; Mn = 60 µg/kg/dia e Fe = 800 µg/kg/dia). Assumindo-se as maiores concentrações de metais encontradas nos mexilhões e considerando-se a massa úmida deles

igual a 6g, as cargas encontradas foram: Zn = 83 µg; Cu = 2 µg; Mn = 41 µg e Fe = 768 µg. Portanto, uma pessoa de 70 kg poderia consumir até 72 mexilhões por dia sem riscos, considerando-se apenas a contaminação por esses metais.

Agradecimentos: Projeto CNPq/Mapa/SDA 577906/2008-9 Edital 64.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica "Carlos Chagas Filho", Laboratório de Radioisótopos "Eduardo Penna Franca"
Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: adan_lino@hotmail.com

Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* para produção de insumos com valor diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose

Characterization of antigenic composition of Neospora caninum for the production of diagnostic kits and vaccine protocols

Macêdo-Júnior, A.G.; Santiago, F.M.; Silva, M.V.; Ferreira, F.B.; Cunha-Junior, J.P.; Silva, D.A.O.; Mineo, T.W.P.; Mineo, J.R.

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa, filogeneticamente relacionado ao *Toxoplasma gondii*. Relacionado a abortamento bovino desde a década de 90, tem despertado interesse crescente de pesquisadores do mundo todo. A julgar pelo fato que o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, considera-se que o impacto dessa parasitose sobre a cadeia de produção de carne e leite nacionais apresente importante magnitude. Vários tipos de vacinas contra *N. caninum* têm sido avaliadas, contudo a proteção conferida é parcial e dependente dos adjuvantes utilizados. O diagnóstico laboratorial da neosporose é classicamente realizado com o teste de imunofluorescência indireto, que apresenta limitações como a interpretação subjetiva do observador. Objetivando avaliar o perfil de reconhecimento antigênico em bovinos com infecção por *N. caninum*, amostras de soro foram avaliadas por Western blot (WB). Após o tratamento das amostras sorológicas com 6M de ureia a banda de 42 kDa passou a não ser reconhecida em soros de fase aguda, indicando ser um possível marcador de infecção recente da neosporose. Quando realizada análise com amostras de fase crônica da doença, houve o surgimento de proteínas de baixo peso molecular, variando entre 23-29 kDa, reconhecidas por anticorpos de alta avidéz. Esses dados podem indicar que proteínas de baixo peso molecular possuem potencial para serem utilizadas na produção de insumos como marcadores de fase crônica da doença de neosporose. Para avaliar o perfil sorológico de reação cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii*, o soro de animais infectados com ambos os parasitos foi submetido a WB contendo antígenos solúveis de *N. caninum* (NLA), a antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), a antígeno secretado/excretado de *T. gondii* (ESA) e a STAg sem a presença de antígeno secretado/excretado de *T. gondii* (STAg-ESA). Por ELISA, pode ser observado que soros de animais infectados com *N. caninum* não apresentaram reatividade cruzada com ESA (IE < 1,0), mas todos os animais apresentaram IE > 1,2 quando submetidos à reação com STAg-ESA. Por WB, as mesmas amostras de soro não reconheceram proteínas de baixo peso molecular de STAg, apresentando reatividade cruzada com bandas de 80, 53, 46 e 42 kDa. Ainda avaliando-se reatividade cruzada desses animais, foram constatadas reação cruzada com proteínas de 82 kDa de ESA e 82 e 75 kDa de STAg-ESA. Assim, o presente projeto apontou alvos proteicos para a confecção de ensaios específicos para o diagnóstico, bem como protocolos seguros e eficientes de vacinação contra a neosporose bovina.

Apoio: Mapa/SDE/CNPq, Capes, Fapemig.

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Laboratório de Imunoparasitologia "Mario Endsfeldz Camargo"
Av. Pará, 1720, CEP 38402-030, Uberlândia, MG, Brasil.
E-mail: jrmineo@ufu.br

Aumento da competência científica e tecnológica no controle da *Neospora caninum* em bovinos na defesa agropecuária nacional*

Increase of scientific and technology competence to control *Neospora caninum* in cattle for agricultural national defense

Pereira, G. R.¹; Bohrer, R. C.¹; Nóbrega Junior, J. E.¹; Andrade Neto, O. A. S.¹; Rigo, M.¹; Rissi, V. B.¹; Toscan, G.²; Vogel, F. S. F.²; Oliveira, J. F. C.¹; Gonçalves, P. B. D.¹

A neosporose é uma enfermidade parasitária considerada como uma das principais doenças reprodutivas em animais domésticos de produção em todo o mundo. Grande parte das infecções em bovinos é originária da transmissão vertical. Sendo assim, os principais objetivos deste estudo foram: determinar a patogenia da infecção transplacentária em fêmeas bovinas inoculadas com *N. caninum*; padronizar as técnicas de extração de DNA do *N. caninum* utilizando-se diferentes tecidos obtidos de modelos experimentais; e implementar a técnica de qPCR para diagnóstico de neosporose e determinar a presença de *N. caninum* nas diferentes áreas do sistema nervoso e nos diferentes órgãos de fetos bovinos. Camundongos foram submetidos à inoculação de *N. caninum* e sacrificados para coleta de segmentos do sistema nervoso central para padronização das técnicas de detecção por PCR convencional. Para a obtenção do antígeno, taquizoítos da cepa NC-1 do *N. caninum* foram inoculados em cultivo de células Vero para multiplicação até alcançar um título aproximado de 1×10^7 taquizoítos/mL. Trinta vacas soronegativas ao protozoário foram alocadas em diferentes grupos: G1 (n = 9) inoculação com *N. caninum* e após 60 dias foram submetidos ao protocolo de IATF (60d + IATF); G2 (n = 11) inoculação com *N. caninum* 60 dias após a IATF (IATF + 60d); e G3 (n = 9) soronegativas para *N. caninum* submetidos a IATF (controle). Os animais foram monitorados por ultrassonografia 35 dias após IATF até a interrupção da gestação por cesárea aos 170 dias para a realização das análises do tecido fetal. As amostras fetais foram submetidas à extração de DNA para avaliação quantitativa da presença do *N. caninum* por qPCR com a utilização de uma sonda TaqMan desenhada a partir da sequência do gene Nc5 (GenBank: X84238). Como controle, foi utilizada a detecção através de PCR convencional, amostras de taquizoítos cultivados *in vitro* e IPC para a reação de presença/ausência pela técnica de TaqMan. As taxas de prenhez aos 35 dias dos animais previamente inoculados 60d + IATF (4/9; 44,4%) foram maiores do que no grupo-controle (8/9; 88,8%) ($P < 0,05$). Aos 60 dias, o grupo 60d + IATF (0/4; 0%) mostrou-se diferente quando comparado aos grupos IATF + 60d (5/7; 71,4%) e controle (6/8; 75,0%) ($P < 0,05$). Com a TaqMan foi observada a presença do DNA de *N. caninum* no bulbo olfatório e córtex posterior direito de 3/5 fetos provenientes do grupo inoculado após a IATF. Com esses resultados ficou demonstrado que a técnica de qPCR mostrou-se capaz de detectar o DNA do protozoário no SNC fetal. Conclui-se que houve infecção transplacentária nos animais inoculados após a IATF e que o protozoário *N. caninum* interferiu negativamente na gestação dos animais inoculados.

*Capes, CNPq.

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.
E-mail: gabrielrp@biorep.ufsm.br

²Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Parasitárias, Santa Maria, RS, Brasil.

Detecção de anticorpos anti *Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta*

Detection of antibodies against *Neospora caninum* in individual and bulk milk samples from cattle by the technique of indirect immunofluorescence assay

Camillo, G.¹; Pereira, G. R.²; Cezar, A. S.¹; Antonello, A. M.¹; Sangioni, L. A.¹; Flores, E. F.¹; Rosa, P. R. A.²; Muller, L.³; Gonçalves, P. B. D.²; Vogel, F. S. F.¹

Neospora caninum é um agente envolvido em perdas reprodutivas em bovinos. Essas manifestações induzidas pelo parasito causam relevantes prejuízos aos rebanhos de corte e leite. O diagnóstico dessa infecção é de grande importância, principalmente para programas de erradicação e controle. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: adaptar uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite, a partir de uma RIFI padronizada para a detecção desses anticorpos no soro sanguíneo; analisar a concordância entre a detecção desses anticorpos pela RIFI no soro sanguíneo e no leite de fêmeas bovinas; e avaliar a viabilidade da RIFI para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras coletivas de leite. Foram testadas amostras de soro sanguíneo e de leite, coletadas de 112 vacas em lactação, e seis amostras coletivas de leite, correspondentes a cada uma das propriedades avaliadas localizadas na região central do Rio Grande do Sul. As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea e identificadas individualmente. As amostras de leite individuais foram coletadas de todos os animais em lactação, em tubos de ensaio estéreis. Em cada propriedade, foi coletada uma amostra coletiva de leite, 15 mL aproximadamente, do tanque refrigerado, o qual continha a totalidade do leite coletado das vacas avaliadas. A pesquisa de imunoglobulinas da classe G anti-*N. caninum* no soro sanguíneo e no leite foi efetuada pela RIFI. Encontrou-se 78% de concordância entre a detecção de anticorpos no soro sanguíneo (com título de anticorpos ≥ 50) e no leite, com sensibilidade de 90% e especificidade de 100% para a RIFI nas amostras de leite. Entretanto, para as vacas com títulos de anticorpos ≥ 100 no soro sanguíneo, tanto a concordância como os valores de sensibilidade e especificidade da RIFI no leite foram de 100%. Todas as amostras coletivas de leite foram positivas na RIFI. Isso demonstra que, conforme a propriedade, pode-se eleger com segurança qual a melhor abordagem diagnóstica a ser adotada em relação à coleta de soro sanguíneo ou de leite para a pesquisa de *N. caninum* pela RIFI. Além disso, a determinação da presença de anticorpos em amostras coletivas de leite pode servir para diagnóstico e triagem de rebanhos com animais infectados.

*Capes, CNPq.

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Parasitárias Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.