

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO  
INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI –  
*Neospora caninum* EM BOVINOS**

**LUCIANA DOS SANTOS FREITAS**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO – 2014

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO  
INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI –  
*Neospora caninum* EM BOVINOS**

**LUCIANA DOS SANTOS FREITAS**

Bacharel em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO - 2014**

## FICHA CATOLOGRAFICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
LUCIANA DOS SANTOS FREITAS**

Professor Dr. Alexandre Moraes Pinheiro  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Orientador)

Professor Dr. Fred da Silva Julião  
Instituto Federal Baiano

Professor Dr. Robson Bahia Cerqueira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

CRUZ DAS ALMAS – BA  
AGOSTO - 2014

“A possibilidade de arriscar é que nos faz homens. Vôo perfeito no espaço que criamos. Ninguém decide sobre os passos que evitamos. Certeza que não somos pássaros e que voamos. Tristeza de que não vamos por medo dos caminhos.”

**Damário da Cruz**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pelo Dom da vida e por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, meu apoio, confiança e todo esforço despendido para que eu tivesse uma educação de qualidade.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Moraes Pinheiro, pelos ensinamentos passados, pela sua paciência e por estar sempre presente e disposto a ajudar.

Aos amigos do Laboratório, Cintia, Phillipe, Carol, Bianca, Ângela, Diana, Lilian e Juliana que compartilharam conhecimento e contribuíram de diversas formas para a concretização deste trabalho.

A todos os proprietários que disponibilizaram seu animais para a realização da pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com as coletas em campo.

Ao Laboratório de Diagnóstico das Parasitose de Animais - UFBA

A CAPES por ter concedido a bolsa de pós-graduação

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, em especial Evelin e Marilice, que compartilharam as alegrias e dificuldades no decorrer desses dois anos.

Enfim, aqui fica a minha gratidão, a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 HISTÓRICO .....	14
2.2 OCORRÊNCIA DA NEOSPOROSE .....	15
2.3 BIOLOGIA DO <i>N. caninum</i> .....	16
2.4 TRANSMISSÃO .....	18
2.5 SINAIS CLÍNICOS E PATOGÊNIAS DA NEOSPOROSE .....	20
2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÃO .....	21
2.7 DIAGNÓSTICO .....	23
2.8 TRATAMENTO E CONTROLE DA NEOSPOROSE .....	27
2.9 IMPACTOS ECONÔMICOS .....	28
Referências Bibliográficas.....	29
<b>CAPÍTULO 1:</b> Desenvolvimento de teste de hemaglutinação indireta para Detecção de anticorpos Igg Anti – <i>Neospora caninum</i> em bovinos.....	36
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	51

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Microscopia de varredura do processo de invasão das células Vero pelos taquizoítos de *Neospora caninum*..... 18

**Figura 2** - Ciclo biológico do protozoário *Neospora caninum*, com representação das duas vias de transmissão..... 20

**Figura 3** – Reação positiva do teste de hemaglutinação indireta.....26

## CAPITULO 1

**Figura 1** - Reação de hemaglutinação para a detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* A - Reação negativa e B – Reação positiva.....42

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Frequências de anticorpos anti – *N. caninum* em bovinos de diferentes estados do Brasil..... 16

### CAPITULO 1

**Tabela 1:** Comparação da reatividade de anticorpos IgG anti- *N. caninum* detectados na HAI (1:16) e RIFI (1:200) ..... 45

**Tabela 2:** Comparação da reatividade de anticorpos IgG anti- *N. caninum* detectados na HAI (1:16) e RIFI (1:100) ..... 45

**Tabela 3:** Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) obtidos pela comparação da HAI com RIFI (1:100) e (1:200) ..... 46

## LISTA DE ABREVIATURA

RIFI – Reação de Imunofluorescência indireta

ELISA – Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática

FITC – Isotiocianato fluoresceína

PCR – Reação em Cadeia Polimerase

Nc – *Neospora caninum*

IFN -  $\gamma$  – Interferon gama

IL – Interleucina

TNF - Fator de Necrose Tumoral

$\mu$ l – microlitro

# DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Neospora caninum* EM BOVINOS

**Autor:** Luciana dos Santos Freitas

**Orientador:** Alexandre Moraes Pinheiro

**RESUMO:** A neosporose é uma doença parasitária responsável por gerar perdas econômicas em todo o mundo. Um diagnóstico precoce ajuda a reduzir o impacto causado por essa enfermidade. A detecção de anticorpos IgG circulantes anti-*N. caninum* constitui uma ferramenta importante para o diagnóstico da neosporose. O presente estudo objetivou padronizar o teste de hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos IgG anti – *Neospora caninum*. Utilizou-se hemácias de galinha sob 4 diferentes tratamentos, observou-se o tempo de precipitação, quantidade de hemácia, e durabilidade da estocagem. Após a padronização das hemácias foi feita a conjugação com taquizoitos. Amostras de dez soro controle positivos comprovada pela reação imunofluorescência indireta (RIFI) foram utilizadas para a padronização do teste de hemaglutinação indireta (HAI). Para validação do mesmo foram coletados sangue de 78 vacas de leite, de diferentes, propriedades que foram submetidas a RIFI com um ponto de corte 1:100 e 1:200 e a HAI (1:16). A RIFI (1:200) detectou 61,3% de animais positivos enquanto a HAI detectou 67%. A sensibilidade e a especificidade obtidos pelo teste desenvolvidos foi 64,8% e 41% respectivamente. Entretanto, ao comparar a HAI com a RIFI(1:100) os valores observados foram de 71% e 66,6% para sensibilidade e especificidade respectivamente. A HAI desenvolvida apresentou uma alta correlação ( $p < 0,001$ ) quando comparada com a RIFI(1:100). O teste utilizado como padrão ouro, o ponto de corte e a natureza do antígeno utilizado são fatores que podem contribuir com este resultado. A hemaglutinação desenvolvida é um teste ideal para triagem podendo ser utilizado em condições de campo.

**Palavras-chave:** Diagnóstico, Hemaglutinação, Imunofluorescência

## **DEVELOPMENT TEST INDIRECT HEMAGGLUTINATION DETECTION OF IgG ANTIBODIES ANTI - *Neospora caninum* IN CATTLE**

**Autor: Luciana dos Santos Freitas**

**Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro**

**ABSTRACT:** The parasitic disease neosporosis is responsible for generating economic losses worldwide. An early diagnosis helps to reduce the impact caused by this disease. Detection of circulating IgG antibodies anti – *N. caninum* is an important tool for neosporosis diagnosis. The aim of this study was to standardize the indirect hemagglutination assay for IgG antibodies - *Neospora caninum* detection. We used chicken RBCs under four different treatments, precipitation time was observed as well as RBC amount, and storage durability. After RBCs standardization, the conjunction with tachyzoites was made. Seropositivity control serum samples verified by indirect immunofluorescence reaction (RIFI) were used for indirect hemagglutination assay standardization (IHA). Seventy eight cattle blood with different properties were collected for this assay validation, and were subjected to RIFI with a 1: 100 and 1: 200 cut-off and to (IHA 1:16). The RIFI (1: 200) detected 61,3% positivity while IHA detected 67%. The sensitivity and specificity obtained by the developed assay was 64,8% and 41 % respectively. However, when comparing IHA with RIFI (1: 100), the values were 71% and 66,6% for sensitivity and specificity, respectively. IHA designed showed a high correlation ( $p < 0.001$ ) compared to IFA (1: 100). The gold standard test used as the cut-off point and the nature of the antigen used are factors that may be contributing to this result. The hemagglutination developed is an ideal screening test.

**Key-words:** Diagnosis, Hemagglutination, immunofluorescence

## 1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença amplamente distribuída em todos os continentes e estima-se que seja responsável por causar grandes impactos econômicos na pecuária. No Brasil, diversos estudos epidemiológicos, demonstram ocorrência do protozoário em todas as regiões. A enfermidade é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Neospora caninum*, o qual apresenta um ciclo de vida semelhante ao *Toxoplasma gondii*. A infecção com o *N. caninum* pode ocorrer através da ingestão de tecidos infectados, ingestão de água e alimentos contaminados com oocisto esporulado, e ainda pode ocorrer pela transmissão através da via transplacentária, aquela da mãe para o feto.

Esse protozoário apresenta, até o momento, alguns canídeos como hospedeiros definitivos e diversas espécies de mamíferos e aves como hospedeiros intermediários. Nos cães a infecção pelo *N. caninum* pode causar alterações neuromusculares e em caso de imunodepressão pode levar o animal a morte. Os canídeos têm um papel fundamental na epidemiologia da doença uma vez que eliminam oocisto do parasito no ambiente. A importância econômica dessa doença é devido ao fato de ser responsável por causar problemas reprodutivos, entre eles o aborto, em espécies de interesse produtivo.

O diagnóstico da doença pode ser feita de forma direta, pela detecção parasitária, ou indireta por exames sorológicos. O sorodiagnóstico é importante para avaliar a exposição e o risco de infecção por *N. caninum* de um rebanho. No entanto, o custo do diagnóstico sorológico no Brasil ainda hoje é um fator limitante para uma melhor avaliação e manejo adequado dessa enfermidade. Diante disso, existe a necessidade de elaboração de um teste sorológico rápido e simples para o diagnóstico da neosporose. A hemaglutinação indireta é um exame utilizado para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, no entanto, ainda não foi proposto para a detecção do *N. caninum*. Esse teste apresenta características que favorecem uma detecção imediata da exposição do animal ao protozoário. Diante disso, objetivou-se com esse trabalho a padronização do teste de hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* em bovinos.

## 2.REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

Em 1984, na Noruega, Bjerkas et al.(1984) identificaram um protozoário associado a encefalites e miosites em cães. Este protozoário possuía características biológicas comportamentais e morfológicas semelhantes ao *Toxoplasma gondii* acredita-se que por muito tempo essas duas espécies foram confundidas. No entanto, mais tarde, perceberam que o parasito em questão diferiam nas características antigênicas e ultra-estruturais (Dubey et al., 1988a).

Outros pesquisadores (Otoole e Jeffrey, 1987; Parish et al., 1987) também suspeitaram que o parasito em questão se tratava de uma nova espécie. Em 1988 Dubey e colaboradores, reavaliando tecidos de cães que tinham morrido com sintomas de toxoplasmose, pela microscopia eletrônica, perceberam que em alguns destes casos o parasito envolvido era estruturalmente diferente do *T. gondii*, além disso, não apresentavam reatividade a anticorpos anti-*T. gondii* (Rosa, 2010). Então, foi proposta a criação do novo gênero *Neospora* e de uma nova espécie *Neospora caninum* (Dubey et al., 1988a). Em 1988 o parasito foi isolado em cultivo celular e em comudongos a partir de tecidos de cães que apresentavam paresia dos membros posteriores. Foi elaborado um teste de imunofluorescência indireta para o diagnostico sorologico viabilizando a realização de estudos epidemiológicos (Dubey et al., 1988b).

No ano de 1993 houve o primeiro relato de isolamento do *N. caninum* em fetos bovino abortados (Conrad et al., 1993). Payne et al. (1996) obtiveram a primeira amplificação do DNA de *N. caninum* pela tecnica de PCR. Entretanto, somente em 1998 Mcallister et al. (1998) identificaram o cão como hospedeiro definitivo desse protozoário. No Brasil a primeira detecção do parasito foi feita por Gondim et al. (1999) pela tecnica de imunohistoquimica realizada em tecidos de um feto

abortado. Posteriormente Gondim et al. (2001) obtiveram o primeiro isolado de *N. caninum* no Brasil, a cepa NC Bahia.

## 2.2 OCORRÊNCIA DA NEOSPOROSE

Desde da sua descrição o parasito já foi detectado em várias espécies de animais vertebrados domésticos e silvestres como em raposas (*Vulpes vulpes*) (ALMERIA et al., 2002), veados de cauda branca (*Odocoileus*) (Vianna et. al., 2005), galinhas (*Gallus domesticus*) (Costa et al., 2008), pardais (*Passer domesticus*) (Gondim et al., 2010), entre outros. Essas espécies podem ter um papel importante na epidemiologia uma vez que a presença desses animais podem afetara prevalência da doença em propriedades rurais (Almería et al., 2013).

Apesar de infectar diversas espécies, *N. Caninum*, assume grande relevância nos bovinos e em caninos. A importância em bovinos está relacionada ao fato de ser uma das principais causas de abortamentos esporádicos, endêmicos e epidêmicos (Canada et al., 2002). Já nos canídeos está relacionada ao seu papel na epidemiologia da doença.

O primeiro caso de neosporose bovina foi relatado em 1989 pelos pesquisadores Thilsted e Dubey. A partir deste relato a neosporose tem sido descrita como a principal causa de abortamento em bovinos (Dubey, 1999). Há registro de ocorrência no México ( Garcia-Vazquez et al., 2009), Tailândia (Inpankaew et al., 2014), Romênia (Enachescu et al., 2014), Irã (Nematollahi et al., 2011), Itália (Otranto et al., 2003).

A presença de *N. caninum* foi descrita na Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (Moore, 2005). Furtado et al., (2011) verificaram que 28,8% dos animais analisados, em uma propriedade leiteira no Uruguai, apresentaram soropositividade para neosporose. No Brasil a primeira detecção sorológica em bovinos foi no Mato Grosso do Sul em 1996 (Brautigham et al., 1996). Corbellini et al. (2000), em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, observaram através de técnicas histológicas que 20% dos fetos abortados contiam lesões compatíveis com as causadas pelo *N. caninum*. Gondim et al.,(2007) observaram que 35,9% dos búfalos analisados, criados no Estado da Bahia, possuíam anticorpos específicos para o parasito em questão. Em um estudo no sudoeste do

Paraná, a ocorrência de anticorpos anti- *N. caninum* foi de 24, 2% (Camilo et al., 2010). Amaral et al.(2012), em estudo realizado em dois estados da região nordeste do Brasil, verificaram através da técnica de PCR que 26,6 % dos fetos abortados foram positivos para *N. caninum* concluindo que o agente está presente e é causa de abortamento nessa região do País

Alguns trabalhos descrevem a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em diferentes locais no Brasil, esses trabalhos podem ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Frequências de anticorpos anti – *N. caninum* em bovinos de diferentes estados do Brasil.

Referências	Local	Nº de Animais	Freq. Positivos	Teste
Amaral et al. (2012)	Pernabuco / Alagoas	306	12,6%	RIFI
Camillo et al. (2010)	Paraná	1778	24,2%	RIFI
Galvão et al.2011	Bahia	755	13%	RIFI
Vogel et al., 2011	Rio Grande do Sul	781	11,4%	ELISA
Martins et al., 2011	Tocantis	192	25%	RIFI
Guedes et al., 2008	Minas Gerais	575	97,2%	RIFI

### 2.3 BIOLOGIA DO *N.caninum*

O *N. caninum* é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae. Este possui características morfológicas semelhantes a outros protozoários do grupo Apicomplexa de importância veterinária como: *T. gondii*, *Hammondia heydorni*, *Isospora spp* e *Sarcocystis spp* (Dubey et al., 2002), porém diferem em ultraestrutura, imunogenicidade e patogenicidade (Dubey et al., 1988a).

O ciclo de vida do parasito é heteroxêno envolvendo hospedeiros definitivos e hospedeiros intermediários. McAllister et al. (1998) identificaram o cão (*Canis familiaris*), Gondim et al. (2004) o coiote (*Canis latrans*), King et. al.(2010) o dingo (*Canis lupus dingo*) e Dubey et al. (2011) o lobo cinza (*CanisLapus*) como hospedeiros definitivos do *N. caninum*. Tem como hospedeiro intermediário uma ampla variedade de espécie de aves e mamíferos incluindo os ruminante (Dubey e Lindsay, 1996).

No ciclo biológico de *N. caninum*, são identificadas três fases parasitárias: os taquizoítos, cistos teciduais contendo bradizoítos e os oocistos contendo esporozoítos (Dubey, 1999). Os taquizoítos e bradizoítos são estágios de reprodução assexuada do parasito que ocorrem nos hospedeiros intermediários enquanto que os oocistos resultam da reprodução sexuada que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo.

Os taquizoítos, fase de multiplicação rápida do parasito, a depender do estágio de desenvolvimento, podem apresentar morfologia ovóide, circulares ou de meia lua e medem 3-7 x 1-5µm (Teixeira, 2010). Estudos já identificaram a presença de taquizoítos em vários tecidos e células (Hemphill et al., 1999), incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, células vasculares endoteliais, miócitos, células endoteliais dos túbulos renais e hepatócitos (Dubey e Lindsay, 1993; Locatelli-Dittrich, 2002). Os taquizoítos são o principal estágio que causa infecção aguda no hospedeiro intermediário (Dong et al., 2012).

Os taquizoítos invadem a células do hospedeiro após 5 minutos de contato (Figura 1), no citoplasma da célula infectada, multiplicam-se por endodiogenia formando vacúolos parasitóforos (Hemphill et al., 1996). Caso não ocorra resposta imunológica efetiva do hospedeiro a multiplicação continua levando a destruição celular e em casos mais graves a morte do hospedeiro. Quando existe uma resposta imune humoral do hospedeiro os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítos, estes por sua vez são envoltos por uma membrana formando o cisto tecidual do *N. caninum* (Oliveira, 2004). Os bradizoítos podem persistir durante a vida do hospedeiro intermediário, sem causar manifestações clínicas significativas (Dubey e Lindsay, 1996).

Os cistos teciduais são considerados como forma de resistência do parasito, e possuem formato oval ou arredondado medindo até 107 µm (Dubey e Lindsay, 1996). São encontrados em tecidos do sistema nervoso central e tecidos extra-neurais (Dubey et al., 2006).

Os oocistos são compreendidos como forma de resistência ambiental do *N. caninum*, e são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos na forma não esporulada (Gondim et al., 2004). Os oocistos não esporulados possuem formato esférico, medem de 10 a 11 µm, e não são infectivos. Após três dias, dependendo das condições do ambiente, os oocistos esporulam e tornam-se infectantes no ambiente (McCallister et al., 1998). Os oocistos esporulados apresentam dois

esporocistos com quatro esporozoítos cada (Dubey et al., 2002) e causam infecção pela via oral. No intestino delgado os esporozoítos penetram nas células epiteliais intestinais se diferenciam em taquizoítos que se multiplicam rompendo as células e disseminando a infecção (Lindsay, 1999).

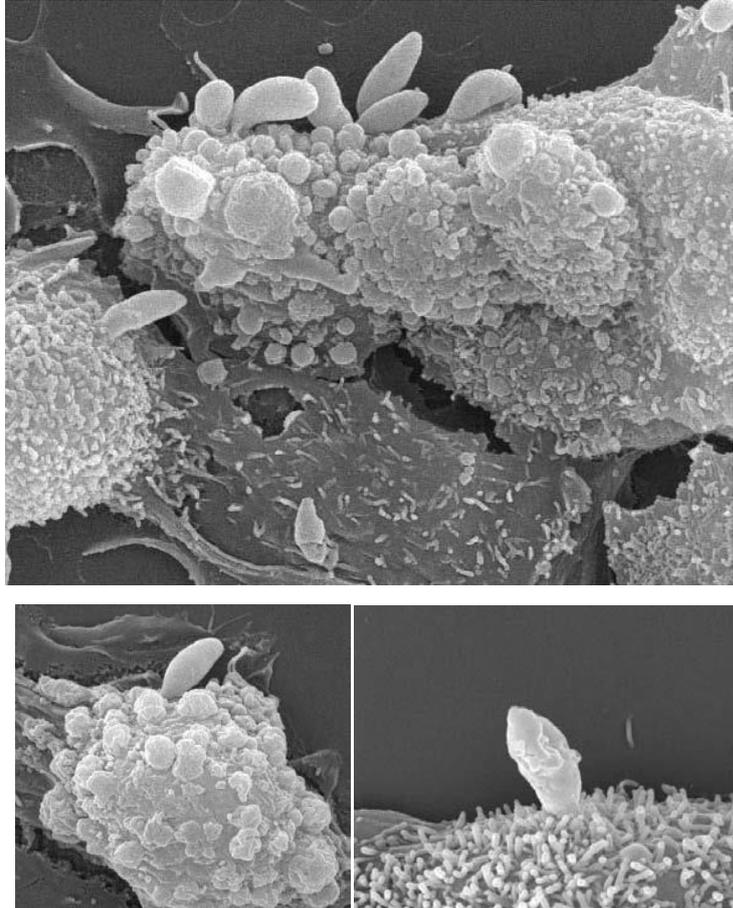


Figura 1. Microscopia de varredura do processo de invasão das células Vero pelos taquizoítos de *Neospora caninum* (Hemphill et al., 2006).

## 2.4 TRANSMISSÃO

A transmissão de *N. caninum* pode ocorrer através de duas principais vias: a horizontal e a vertical (Figura 2). A ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados e ingestão de tecidos infectados por cistos teciduais representam a via de transmissão horizontal (Dubey et al., 2007). Segundo Dubey et al. (2007) dificilmente ocorrerá infecção pela ingestão de tecidos contendo

taquizoítos, mas essa pode também representar uma via de infecção. Entretanto, Modry et al. (2001) discutem a possibilidade de transmissão de *N.caninum* pelo consumo de placenta infectada.

A transmissão transplacentária, representa a via vertical. Esse tipo de transmissão pode resultar em animais cronicamente infectados e clinicamente normais ou com distúrbios neurológicos, fraqueza, dificuldade de ganho de peso e crescimento, podendo ainda levar até mesmo a morte do feto com possibilidade de reabsorção, mumificação ou autólise (Dubey, 1999). Em bovinos, hospedeiros intermediários, a transmissão vertical é a mais freqüente e mais importante, contribuindo consideravelmente para permanência do *N. caninum* no rebanho, ou seja, para a propagação da infecção por gerações sucessivas (Wouda, et al. 1998). A transmissão transplacentária pode ocorrer durante consecutivas gestações, pois à fêmea infectada com o parasito não adquire resistência imunológica e pode transmitir o parasito aos seus descendentes em gestações subseqüentes (Anderson et al., 2000). Essa via de transmissão pode ocorrer após infecção pós-natal de forma exógena através da ingestão de oocistos durante a gravidez ou de forma endógena consequência da infecção persistente da mãe com passagem do parasito para o feto (Williams et al., 2009).

Existe histórico de outras fontes de infecção. Um deles é relatado por Negrão (2006), que verificou a transmissão experimental pela via lactogênica em bezerros e camundongos. Pituco et al. (2005) verificaram a ocorrência de eliminação do protozoário através do sêmen em baixas concentrações porém não se sabe o papel epidemiológico dessa via de eliminação e ainda hoje não existe evidências conclusivas para a transmissão venérea.

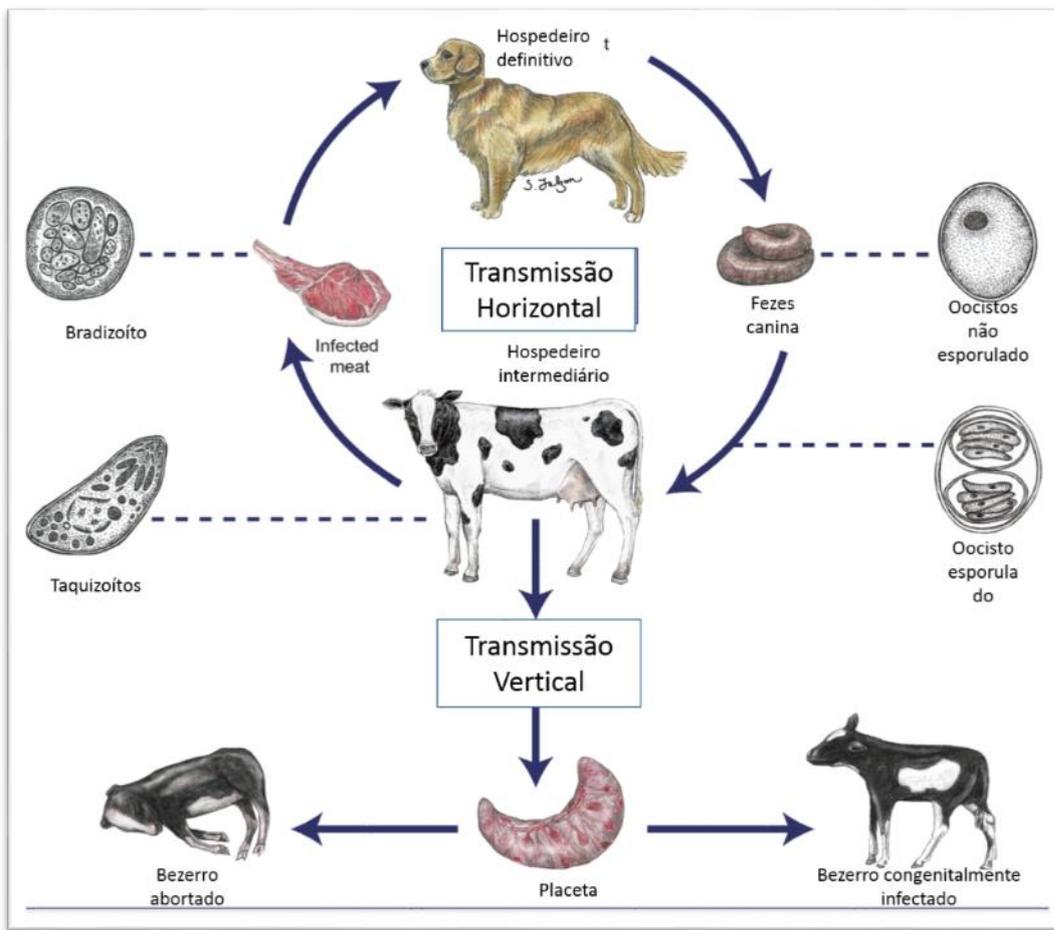


Figura 2. Ciclo biológico do protozoário *N. caninum*, com representação das duas vias de transmissão. (Adaptado de Stephen et al., 2013)

## 2.5 SINAIS CLINICOS E PATOGÊNIA DA NEOSPOROSE

Na maioria dos casos de neosporose não há sintomatologia clínica. A patogenia varia de acordo com a espécie e a capacidade de resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Os processos patogênicos associados a doença em cães são danos neuromusculares, polirradiculoneurite e meningoencefalomielite disseminada. Esses em conjunto determinam a ocorrência de paralisia ascendente e progressiva, convulsões e até a morte do animal (Trupell, 2009). A enfermidade pode ser localizada ou generalizada, com todos os órgãos envolvidos inclusive a pele, com severa dermatite (Junior e Romanelli, 2006). Esses sinais clínicos estão associado a imunossupressão do hospedeiro (Patitucci et al., 1997). Cadelas com

infecção subclínica podem transmitir verticalmente *N. caninum* aos seus fetos (Magalhães et al., 2009).

Os bovinos são os mais susceptíveis a neosporose, nessa espécie a doença está associada a problemas reprodutivos. Má formação fetal, danos neuromusculares, aborto, reabsorção e a mumificação fetal podem ser resultados da infecção pelo parasito. Estudos comprovam que bovinos infectados pela primeira vez durante a gestação podem ter sete vezes mais chances de abortar do que aqueles não infectados (Bartley et al., 2013). *N. caninum* invadem as células do útero bovino, se multiplicam e causam a destruição focal das porções materno-fetal da placenta, desencadeando uma resposta inflamatória. (Barr et al., 1994; Otter et al., 1995). Bezerros neonatos infectados podem apresentar os membros flexionados ou hiperestendidos, ataxia, diminuição do reflexo patelar, perda de consciência, exoftalmia, assimetria ocular e deformidades associadas com lesões de células nervosas, na fase embrionária (Junior e Romanelli, 2006). Existe grande possibilidade que a maioria dos bezerros com neosporose clínica morram dentro das primeiras quatro semanas de vida, entretanto os bezerros cronicamente infectados apresentam aspecto clínico normal (Dubey e Lindsay, 1996).

Alguns pesquisadores já relataram alterações clínicas em equinos que podem ser decorrentes da neosporose. Lindsay et al. (1996) observaram cegueira bilateral em uma fêmea neonata com neosporose. Gray et al. (1996) verificaram a presença de taquizoítos nas lesões no intestino delgado e nos linfonodos mesentéricos, de uma égua de 10 anos de idade. Lesões no sistema nervoso central (SNC) também já foram encontradas por outros autores (Gray et al., 1996).

## 2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÃO

A resposta imune do hospedeiro exerce um papel no combate da infecção pelo *N. caninum*, na ausência desta o animal pode vir a óbito (Nishikawa et al., 2003). A resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção do parasito é mediada pela resposta celular e humoral, ambas já foram observadas em animais naturalmente e experimentalmente infectados (Adrianavarino et al., 2005). Pelo fato do *N. caninum* ser um parasito intracelular obrigatório espera-se que a resposta

imune mediada por células tenha maior importância como resposta protetora (Oliveira, 2004). A imunidade mediada por células exerce um papel fundamental no controle da infecção, principalmente em função da ação sinérgica entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, macrófagos e células natural killer (NK) (HEMPHILL, 1999).

A resposta inata é o primeiro mecanismo de defesa ativado pelo hospedeiro ao detectar a infecção pelo *N. caninum*. Esta envolve a liberação de quimiocinas e ativação de leucócitos que estão envolvidos no processo inflamatório (Taubert et al., 2006). Estudos indicam que a resistência aos protozoários intracelulares, como *N. caninum*, é dependente de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  (interferon-gama), a IL-12, (interleucina-12), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1) e ativação de leucócitos. Durante a infecção aguda, IL-12 é produzida por células fagocíticas infectadas, diferenciando linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em subpopulações produtoras de citocinas pró-inflamatórias. Além disso estimula células NK a produzirem IFN- $\gamma$  ativando macrófagos e eliminando células infectadas pelo parasito, através de mecanismos mediados por óxido nítrico (Boysen et al., 2006; Williams; Trees, 2006). Ensaios experimentais, em camundongos, demonstraram que IFN-  $\gamma$  inibe o crescimento de taquizoítos.

Em vacas cronicamente infectadas, nos primeiros três meses da gestação, a resposta imunológica é mediada através da produção de células Th-1 com produção de IFN-  $\gamma$ , IL-12, e TNF- $\alpha$  (Pescador, 2005). A liberação dessas citocinas age no controle da infecção do protozoário, no entanto pode induzir o aborto e/ ou a reabsorção fetal, devido, a liberação de oxido nítrico. A partir do quinto mês de gestação há um aumento na produção de progesterona e em consequência uma produção de células Th-2 que são responsáveis pela imunidade humoral, e um aumento das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 (Quinn et al., 2002). Essas citocinas, apesar de permitir o desenvolvimento do feto, são pouco eficazes no controle da infecção parasitária aumentando o risco de uma transmissão congênita.

No terceiro trimestre de gestação o risco de abortamento é baixo enquanto a transmissão congênita é alta. Os resultados obtidos por Bartly et al., (2013), mostraram que a fase de gestação é importante para a evolução da doença. Com a crescente maturidade imunológica do feto a gravidade clínica da infecção é menor em comparação com infecções que ocorrem no início da gestação. As infecções no

final da gestação podem gerar bezerros cronicamente infectados, mas clinicamente normais (Bartley et al., 2013).

As células TCD4<sup>+</sup> exercem papel importante na produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum* em estágios tardios de infecção, induzindo a outros mecanismos de proteção (Tanaka et al., 2000). A participação efetiva das diferentes classes de imunoglobulinas na resistência à infecção por *N. caninum* é incerta. Especula-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção, participando da neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente (Innes et al., 2002). A origem de anticorpo em resposta a infecção pode ser demonstrada por meio de diferentes testes de diagnóstico indicado que um animal permanece ou foi infectado com o parasito (Bjorkman e Ugglá 1999).

## 2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da neosporose com os resultados nos resultados dos testes sorológicos associados aos sinais clínicos decorrentes da enfermidade. Os métodos de diagnósticos podem ser classificados em diretos ou indiretos. Os diretos são aqueles que se baseiam na busca do parasito, já os indiretos são os que visam à pesquisa de anticorpos específicos no soro do animal indicando a exposição do animal ao parasito. A detecção de anticorpos e de parasito post-mortem, por histopatologia, inoculação em animais de laboratório e imunohistoquímica, são técnicas utilizadas para o diagnóstico da neosporose (Hemphill et al., 2000).

Os testes diretos são utilizados para estabelecer um diagnóstico definitivo da doença, através da presença de vestígios do parasito em lesões característica da doença (Richtzenhain, 2005). Exames histopatológicos, assim como a técnica de imunohistoquímica, utilizam amostras de tecidos para diagnóstico definitivo. Esses exames devem levar em consideração o estado de autólise do feto, a presença do protozoário, as lesões inflamatórias e ainda a exclusão de outras possíveis causas do aborto (Anderson, 2007). A análise histopatológica nem sempre é possível devido a fatores como: ausência de parasitos em animais congenitamente

infectados e o número reduzido de *N. caninum* em secções de tecidos. Essas características tornam difícil o reconhecimento do taquizoítos nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (Dubey e Schares, 2006).

A presença e a caracterização do parasito, por meio da imunohistoquímica associado ou não a lesões é uma técnica de diagnóstico amplamente utilizada para a detecção de *N. caninum* (Pescador et al., 2007). Por ser uma técnica específica, a imunohistoquímica, é frequentemente utilizada para estabelecer um diagnóstico diferencial entre a neosporose e a toxoplasmose (Dubey et al., 2002). Esta análise apresenta uma especificidade elevada, porém em fetos autolisados a sensibilidade da técnica é considerada baixa (Ortega-Mora et al., 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular frequentemente utilizada para a detecção do DNA do parasito, todavia o seu resultado irá depender das condições do laboratório que efetuará a técnica, do estágio de autólise do material e da manipulação da amostra (Dubey, 2003).

Os testes indiretos, os sorológicos, indicam a ocorrência de complexo antígeno anticorpo através do desenvolvimento de um sinal de natureza variável (Richtzenhain, 2005). Uma ampla variedade de testes sorológicos já foram desenvolvidos para detectar anticorpos anti-*Neospora caninum*, entre eles, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Ensaio imunoenzimático (ELISA) e suas modificações, Aglutinação Direta (DAT), Dot-ELISA (Pinheiro, et al 2005) e immunoblotting (Björkman e Ugglå, 1999).

A reação de imunofluorescência indireta utiliza antiimunoglobulinas marcada com fluorocromo para a detecção da reação antígeno-anticorpo (Roitt et al, 2003). Nesta reação, o conjugado, quando ligado ao anticorpo específico e exposto à luz ultravioleta é excitado e emite uma luz visível indicando a positividade. A RIFI para neosporose foi adaptada por Dubey et al., em 1988b, dentre todos os testes sorológicos existentes a RIFI é o teste utilizado como referência para o diagnóstico da neosporose por apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade. A interpretação dos resultados dessa técnica exige que seja executada por profissionais bem treinados a fim de prevenir ocorrência dos falsos resultados.

No teste de ELISA a reação antígeno anticorpos é detectada por meio da conjugação de um dos componentes com uma enzima, de maneira que essa enzima que age sobre substrato produzindo uma coloração. O teste apresenta uma sensibilidade de 89% e uma especificidade de 97% quando utiliza o antígeno total

(Venkastein e Wakeli, 1993), e quando utiliza antígenos recombinantes a sensibilidade e a especificidade pode ser de até 98% e 100% respectivamente (Schaes et al., 1998), quando comparado com a RIFI. Alvarez-García et al. (2013) avaliaram o desempenho de dez testes de ELISA comercializados atualmente e todos mostraram-se perto de um perfeito acordo. Apesar da eficiência comprovada esses testes apresentam algumas características limitantes como a requisição de anticorpos específicos para cada espécie, frequentes reações cruzadas, e a necessidade de equipamentos de leitura para sua realização.

O método de imunoblotting consiste em uma técnica molecular utilizada para a imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para a membrana adsorvente (Kurien e Scofield, 2006). Através desta técnica é possível detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, mesmo que estejam em baixa quantidade na amostra (Kurien e Scofield, 2006). Esse método é considerado altamente sensível e específico sendo o método eleito para o diagnóstico de inúmeras doenças dos animais (Cooley et al., 2001). Staubli et al. (2006) verificaram que o imunoblotting possui uma elevada sensibilidade (98%) e especificidade (100%) quando comparado com o ELISA convencional, e ainda, de acordo com esses mesmos autores a técnica de imunoblotting é um instrumento apropriado para complementar o ELISA convencional para o diagnóstico sorológico da neosporose bovina. No entanto, o uso na rotina diagnóstica ainda é insipiente, por se tratar de uma técnica que necessita mão-de-obra qualificada e por apresentar custo relativamente superior quando comparado a métodos convencionais e métodos alicerçados em base da biologia molecular (Miguel et al., 2012).

Reações de aglutinação são empregadas para o diagnóstico laboratorial de doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos (FERREIRA e ÁVILA, 1996). O teste de aglutinação direta modificado para *N. caninum* foi desenvolvido a partir do teste de aglutinação direta para toxoplasmose por Packham et al. (1998) e demonstrou-se um teste de execução rápida, de fácil utilização e com sensibilidade (100%) e especificidade (97%) elevada quando comparado com o ELISA.

A hemaglutinação é uma reação de aglutinação que utiliza eritrócitos como suporte para a conjugação do antígeno. Nessa técnica, quando o anticorpo específico estiver presente no soro analisado, reconhecem os antígenos

conjugados na superfície dos eritrócitos, causando a aglutinação (Figura 3). Esta reação é utilizada para detecção de anticorpos específicos de diversas doenças parasitárias entre elas a toxoplasmose e doença de chagas. É considerado um excelente método de diagnóstico, devido à sua alta sensibilidade e simplicidade de execução (Fialho e Araújo, 2002). Camargo et al (1989), destacam a leitura dos resultados, através de uma observação visual direta sem a necessidade de equipamentos dispendiosos, como uma característica vantajosa da técnica. Na reação de hemaglutinação indireta as hemácias são suportes para antígenos que são adsorvidos à sua superfície, funcionando como um sistema indicador sensível na detecção de anticorpos. Em geral, antígenos polissacarídeos não muito purificados se fixam sem a necessidade de um pré-tratamento. Já os antígenos proteicos necessitam de um tratamento prévio das hemácias para sua aderência na superfície. Segundo Ferreira e Ávila (1996) as hemácias estão entre os melhores suportes de antígenos para os testes de aglutinação. As hemácias possuem uma superfície complexa, o que facilita a ligação de muitos antígenos e ainda podem ser fixadas em formaldeído ou glutaraldeído, o que soluciona o problema da fragilidade e da estocagem por longos períodos de tempo (Ferreira e Ávila, 2001).

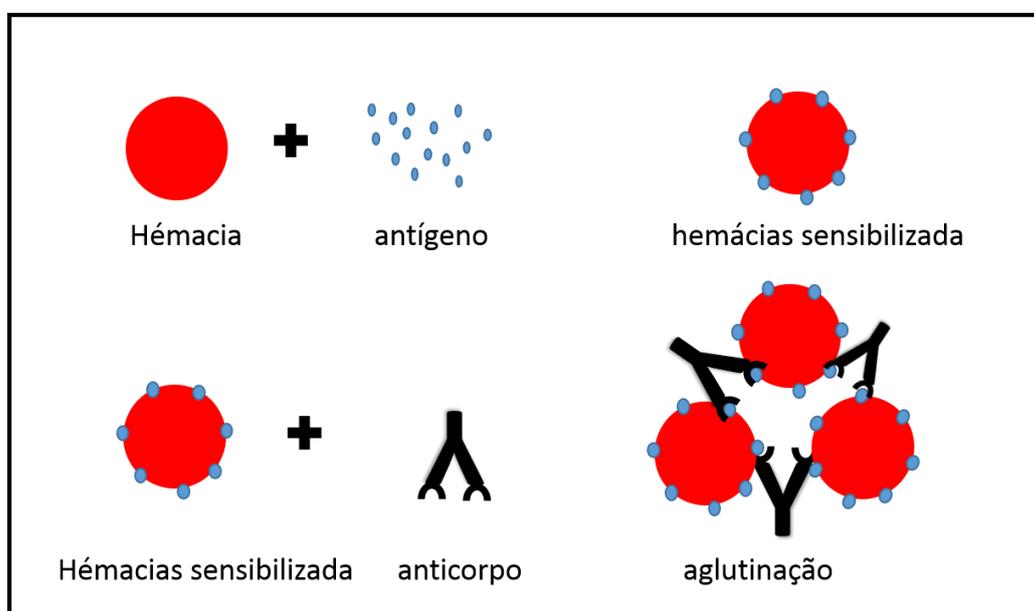


Figura 3: Reação positiva de hemaglutinação indireta.

Trabalhos utilizando hemácias de diferentes espécies para a detecção de infecções virais, bacterianas e por protozoários constatam que a hemaglutinação indireta pode ser utilizada para a detecção de anticorpos de diversas parasitoses. Sanchez-Ruiz et al. (1985) utilizaram hemácia de camundongos para o diagnóstico da malária e obtiveram uma sensibilidade igual a reação de imunofluorescência indireta havendo uma elevada concordância entre esses testes. Sasaki et al. (1996) padronizaram o teste de hemaglutinação empregando eritrócitos de ganso e também obtiveram resultados satisfatórios. No diagnóstico da sífilis, doença bacteriana, a reação apresenta uma sensibilidade de 100% e especificidade de 99,7% (Wama, 2012).

## 2.8 TRATAMENTO E CONTROLE DA NEOSPOROSE

Ainda hoje, não existe nenhum método eficaz de tratamento da neosporose. Os medicamentos existentes para essa enfermidade consistem na combinação do trimetoprim, pirimetamina, sulfonamidas e clindamicina. No entanto o grau de eficiência dessas drogas geralmente é baixo (Neves et al., 2010).

As medidas de controles têm sido discutidas para a redução da infecção por *N. caninum*. O acompanhamento do status sorológico dos animais pode ser utilizado como ferramenta de previsão para identificar animais infectados e conseqüentemente qual o risco de aborto (Almería et al., 2013). A vacinação é uma medida importante para o controle de doenças, no entanto apesar de diversos testes com vacinas para imunização, contra o protozoário nenhuma obteve grande sucesso. As vacinas comerciais existentes no mercado aumentam a resposta imune celular e a produção de IFN $\gamma$ , contudo não conseguem impedir a transmissão transplacentária do parasito (Rodrigues et al., 2009). Um dos desafios para a produção da vacina é obter a imunização protetora de animais que já foram sensibilizados pelo parasito (Bielsa et al., 2004). Recentemente uma vacina foi retirada do mercado por produzir resultados ambíguos e por ter uma eficácia relativamente baixa (Monney e Hemphill, 2014). A vacina composta por taquizoítos inativados de *N. caninum* mostrou ter uma eficácia razoável reduzindo 46,2% dos abortamentos bovinos (Bielsa et al., 2004).

As estratégias atuais de controle da neosporose envolvem gestão agrícola e técnicas de biossegurança (Bartley et al., 2013). Bruhn et al., (2012) observaram que medidas sanitárias ruins estão diretamente relacionadas com as maiores taxas de soropositividade em bovinos. Tentar limitar o ciclo de vida do parasito, através do controle dos hospedeiros definitivos e intermediários nas propriedades de criação e a substituição paulatina de matrizes infectadas são alternativas que minimizam a presença do protozoário na propriedade. Em fazendas com abortamentos endêmicos aconselha-se identificar os animais infectados e envia-los para o abate ou cria-los seletivamente. Já em fazendas com abortamentos epidêmicos deve-se evitar o contato entre o rebanho e o hospedeiro definitivo (Dubey et al, 2007). A inseminação artificial e a transferência de embriões também são medidas importantes para o controle da neosporose.

## 2.9 IMPACTOS ECONÔMICOS

Acredita-se que a neosporose causa um grande impacto na economia agropecuária mundial. Apesar de não ter relatos precisos do prejuízo em escala global estima-se que seja de milhões de dólares. As perdas são difíceis de serem avaliadas por não haver sinais clínicos em bovinos adultos, não havendo avaliações precisas (Dubey e Schares, 2011). Os gastos estão relacionados tanto aos valores dos fetos abortados, quanto aos gastos indiretos como: a necessidade de auxílio de um profissional, redução da vida reprodutiva e gastos com diagnósticos (Reichel et al, 2013)

Em uma pesquisa sobre os prejuízos econômicos decorrente da neosporose, Reichel et al. (2013), verificaram que as perdas médias globais anuais são estimadas em mais de um bilhão de dólares, sendo que a América do Norte é responsável por 65,75% do total, seguida da América do Sul.

## Referências Bibliográficas

ALMERIA, F.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Research in Veterinary Science**, v. 30, p.1-7, 2013.

ALMERIA, S.; FERRER, D.; PABON, M.; CASTELLA, J., MAÑAS, S., Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Barcelona, v.107, p.287-294, 2002.

ALVAREZ-GARCÍA, G.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D.; NAVARRO-LOZANO, V.; PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ORTEGA-MORA, L. M. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 85-95, 2013.

AMARAL, R.L.G.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO, J. J.W.; SOUZA, N.O.L.; LEAL C.A.S.; PORTO W.J.N.; BARBOSA J.M.P.; MOTA R.A. *Neospora caninum* em bovinos em matadouros de Pernambuco e Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.10, p.963-966, 2012.

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

ANDRIANARIVO, A.G., ANDERSON, M.L., ROWE, J.D., GARDNER, I.A., REYNOLDS, J.P., CHOROMANSKI, L., CONRAD, P.A. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, v.96, p.24–31, 2005.

BARR, B. C.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; BONDURANT, R. H.; ARDANS, A. A.; OLIVER, M. N.; CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 207-215, 1994.

BARTLEY, P. M.; KATZER, F.; ROCCHI, M. S.; MALEY, S. W.; BENAVIDES, J.; NATH, M.; PANG, Y.; CANTÓN, G.; THOMSON, J.; CHIANINI, INNES, E. A. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. **Veterinary Research**, v.44, n.91, p. 1-14. 2013.

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

BRAUTINGAM, F. E.; HIETALA, S. K.; GLASS, R. Resultados de levantamentos sorológicos para espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. 1996. Campo Grande. **Anais...Campo Grande: PANVET**, 1996, p. 15-24.

BRUHN, F. R. P.; FIGUEIREDO, V. C.; ANDRADE, G.S.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ROCHA, C.M.B.M.; GUIMARÃES, A.M. Occurrence of anti-*Neospora caninum*

antibodies in dogs in rural areas in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.161-164, 2012.

CAMARGO, M. E.; MOURA, M. E. G.; LESER, P.G.; Toxoplasmosis serology: An eficiente hemagglutination producedure to detect IgG and IgM antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, n.4, p.279-285, 1989.

CAMILLO, G.; CADORE, G.; CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; BRÄUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; F.VOGEL, F.S.F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1511-1513, 2010.

CAMILLO, G.; CADORE, G.; CEZAR, A.S.; TOSCAN, G.; BRÄUNIG, P.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.6, p.1511-1513, 2010.

CANADA, N.; ROCHA, A.; MEIRELES, C.S.; COSTA, J. M. Neosporose em Portugal e novos métodos de diagnóstico e isolamento do parasita. Congresso de Ciências Veterinárias. 2002.

CORBELLINI, G.L; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. DIAS, M. M. Aborto Bovino Por *Neospora Caninum* no Rio Grande Do Sul Bovine Abortion Due To *Neospora Caninum* In Rio Grande Do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, n.30, v.5, p.863-868, 2000.

COSTA, K. S.; SANTOS, S. L.; UZEDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; ARAUJO, F.R.; MCALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P.; Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p.157–159, 2008.

DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; KOHSAKA, T; IKE, N; ENOCH, Y. Development of Two Murine Antibodies against *Neospora caninum* Using Phage Display Technology and Application on the Detection of *N. caninum*. **BMC Biotechnology**, v.12, n.19, p. 7-9, 2012.

DUBEY J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 214, p. 1160-1163. 1999.

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

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

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, 1988a.

DUBEY, J. P. et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

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

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology e control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323 – 367, 2007.

DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., RAJENDRAN, C., MISKA, K., FERREIRA, L.R., MARTINS, J., KWOK, O.C.H., CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, 181, 382–387, 2011.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v.9, p.452–458. 1993.

ENACHESCU, V.; IONITA, M.; MITREA, I. L.; Comparative study for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in milk and sera in dairy cattle in southern Romania. **Acta Parasitologica**, v. 59, n.1, p. 5–10, 2014.

FERREIRA, A W; ÁVILA, S L M. Diagnóstico de Laboratório das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação Clínico-Laboratorial. 2º. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.

FERREIRA, A W; ÁVILA, S. L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. 302 p.

FIALHO, C.G.; ARAÚJO, F.A.P. Comparação entre os testes de imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 3, p. 185-189, 2002.

FURTADO, A.; ROSADILLA, D.; CATTÁNEO, M.; BERMÚDEZ, J.; PUENTES, R.; Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em pequenas propriedades leiteiras do Uruguai. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.673-675, 2011 (NOTA)

GALVÃO, G.DA S.; GONDIM, L.F.P.; PEREIRA, M.J.S., DE OLIVEIRA, U.V.; MUNHOZ, A.D. Soropositividade para *Neospora caninum* e associação ao abortamento e natimortos em rebanhos leiteiros do sudeste da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.4, p.234-237, 2011.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A. O.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; McALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally

infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 1-7, 2001.

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

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O. Frequency of antibodies anti-*Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Bahia State. **Revista Brasileira Saúde Prod.**, v.8, n.2, p. 92-96, 2007.

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, n. 71-75, 1999.

GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M.; GONDIM, L. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.121–124, 2010.

GUEDES, M.H.P.; GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M.; HIRSCH, C. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 189-194, 2008.

HEMPHILL, A. Subcellular localization and functional characterization of Ncp43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect. Immun.*, v.64, p.4279–4287, 1996.

INPANKAEW, T.; JITTAPALAPONG, S.; MITCHELL, T. J.; SUNUNTA, C.; IGARASHI, I.; XUAN, X.; Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows in Northern provinces, Thailand. **Acta Parasitologica**, v.59, n. 2, p. 305–309, 2014.

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

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. *Methods*. San Diego. v.38, p.283-293, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no Estado do Paraná, Brasil. 2002. 184p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em eqüinos no Estado do Paraná, Brasil. 2002. 184p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MAGALHÃES, V. C. S.; SICUPIRA, P. M. L.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães do Município de Ilhéus, Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 306-311. 2009.

MARTINS, N. E. X.; FRESCHI, C. R.; BAPTISTA, F.; MACHADO, R. Z.; COSTA FREITAS, F.L.C.; ALMEIDA, K. S. Ocorrência de anticorpos Anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do Município de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n.3, p.231-238, 2011.

McALLISTER, M. M.; HUFFMAN, E. M.; HIETALA, S. K.; CONRAD, P. A.; ANDERSON, M. L.; SALMAN, M. O. Evidence suggesting a point source exposure in na outbreak of bovine abortion due to neosporosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Oxford, v.8, n.3, p.355-357, 1996.

MCALLISTER, M. M; DUBEY J. P.; LINDSAY D.S.; JOLLEY W. R, WILLS R. A.; MCGRAHM, A. M. Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**, v 28, n.9, p. 1473-1478. 1998.

McNAMEE, P. T.; JEFFREY, M. *Neospora*-associated bovine abortion in Northern Ireland. **Veterinary Record**, v.134, p.48, 1994.

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

MORRE, D.P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 87-97, 2005.

NEMATOLLAHI, A.; JAAFARI, R.; MOGHADDAM, GH. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle in Tabriz, Northwest Iran. **Iranian J Parasitol.**, v. 6, n.4, p.95-98, 2011.

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 175-184, 2003.

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Veterinary Record**, v.121, n.24, p.563-566, 1987.

OLIVEIRA, M. O. Produção de antígenos de *Neospora caninum* e realização de imunoflorescência indireta em cães. 2004. 53p. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Agosto/2004.

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

OTTER, A.; JEFFREY, M.; GRIFFITHS, I. B.; DUBEY, J. P. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. **The Veterinary Record**, v. 136, p. 602-606, 1995.

PARISH, S. M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T. E.; WEIDNER, J. P.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D. P.; LEATHERS, C. W. Myelitis associated with protozoal infection

in newborn calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n.12, p.1599-1600, 1987.

PATITUCCI, A. N.; ALLEY, M. R.; JONES, B. R.; CHARLESTON, W. A. Protozoal encephalomyelitis of dogs involving *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.45, n.6, p.231-235, 1997.

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

PESCADOR, C. A.; Aborto bovino por *Neospora caninum*: Fatores Associados ao resultado positivo da imunoistoquímica. 2005. 76p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

PINHEIRO, A.M.; COSTA, M.F.; PAULE, B.; VALE, V.; RIBEIRO, M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R. E.; ALMEIDA, M. A. O.; MEYER, R.; FREIRE, S. M. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot- ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 73-79, 2005.

PACKHAM, A. E.; VERLOW, K. W.; CONRAD, P. A. et al. A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **American Society for Microbiology**, v. 5, n.4, p. 467-473, 1998.

QUINN, H.E., ELLIS, J.T., SMITH, N.C. *Neospora caninum*: a cause of immunemediated failure of pregnancy? **Trends Parasitology**, V.18, p.391–394, 2002.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, A. M.; GONDIM, L.F.P.; ELLIS, J.T.; What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013.

ROSA, L.D. Prevalência e fatores de risco para infecção por *Neospora caninum* em ovinos no município de Lages, Santa Catarina, Brasil. 2010. 53p. Universidade do estado de Santa Catarina. Lages –SC.2010.

SANCHEZ-RUIZ, M.C.A.; CAMARGO, M. E.; CONEVIVA, A. C.; FERREIRA, A.W.; Teste de hemaglutinação na sorologia da malária humana empregando hemácias parasitadas pelo *Plasmodium Berghei*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n.2, p. 85-93, 1985.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONROTHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-89, 1998.

SESAKI, A. T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; NAKAMURA, P. M.; VAZ, A. J.; CAMARGO, E. D.; SILVA, M. V., Sorodiagnóstico da doença de chagas: Novo reagente para o teste de hemaglutinação indireta (THAI). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, n.2, p. 137-144. 1996.

STAUBLI, D.; NUNEZ, S.; SAGER, H.; SCHARES, G.; GOTTSTEIN, B. Neospora caninum immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. **Parasitology Reserh**, v.99, p.648–658, 2006.

TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; NIKAMI, T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective imune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 183-191, 2000.

TEIXEIRA, M.C. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* em cães no Municípios de Porto Alegre, RS. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado) -Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

THILSTED, J. P.; DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal Veterinarian Diagnostic Investigation**, Columbia, v.1, n.3, p.205-209, 1989.

TRUPPEL, J. H. Avaliação do parasitismo em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e sua atuação como hospedeiro intermediário de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. 2009. 194p. Universidade Federal do Paraná. Curitiba– PR.

VENKASTEIN, P.; WAKELI, D. ELISAs for parasitologist: or lies, dammed lies and ELISAs. **Parasitology Today**, v. 9, p. 228-407, 1994.

VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.36, n.6, 2006.

WILLIAMS, D.J.L.; HARTLEY, C.S.; BJORKMAN, C.; TREES, A. J.; Endogenous and exogenous transplacental trasmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v.136, p.1895–1900. 2009.

WOUDA, W.; BRINKHOF, J.; VAN MAANEN, C.; DE GEE, A.L.; MOEN, A.R. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunological**. v.5, p.711-716, 1998.

## CAPITULO 1

### **DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Neospora caninum* EM BOVINOS**

1. Artigo submetido ao comitê editorial Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia

## **DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI – *Neospora caninum* EM BOVINOS**

**Autor:** Luciana dos Santos Freitas

**Orientador:** Alexandre Moraes Pinheiro

**RESUMO:** A neosporose é uma doença parasitária responsável por gerar perdas econômicas em todo o mundo. Um diagnóstico precoce ajuda a reduzir o impacto causado por essa enfermidade. A detecção de anticorpos IgG circulantes anti- *N. caninum* constitui uma ferramenta importante para o diagnóstico da neosporose. O presente estudo objetivou padronizar o teste de hemaglutinação indireta para a detecção de anticorpos IgG anti – *Neospora caninum*. Utilizou-se hemácias de galinha sob 4 diferentes tratamentos, observou-se o tempo de precipitação, quantidade de hemácia, e durabilidade da estocagem. Após a padronização das hemácias foi feita a conjugação com taquizoitos. Amostras de dez soro controle positivos comprovada pela reação imunofluorescência indireta (RIFI) foram utilizadas para a padronização do teste de hemaglutinação indireta (HAI). Para validação do mesmo foram coletados sangue de 78 vacas de leite, de diferentes, propriedades que foram submetidas a RIFI com um ponto de corte 1:100 e 1:200 e a HAI (1:16). A RIFI (1:200) detectou 61,3% de animais positivos enquanto a HAI detectou 67%. A sensibilidade e a especificidade obtidos pelo teste desenvolvidos foi 64,8% e 41% respectivamente. Entretanto, ao comparar a HAI com a RIFI(1:100) os valores observados foram de 71% e 66,6% para sensibilidade e especificidade respectivamente. A HAI desenvolvida apresentou uma alta correlação ( $p < 0,001$ ) quando comparada com a RIFI(1:100). O teste utilizado como padrão ouro, o ponto de corte e a natureza do antígeno utilizado são fatores que podem contribuir com este resultado. A hemaglutinação desenvolvida é um teste ideal para triagem podendo ser utilizado em condições de campo.

**Palavras-chave:** Diagnóstico, Hemaglutinação, Imunofluorescência

## **DEVELOPMENT TEST INDIRECT HEMAGGLUTINATION DETECTION OF IgG ANTIBODIES ANTI - *Neospora caninum* IN CATTLE**

**Autor:** Luciana dos Santos Freitas

**Orientador:** Alexandre Moraes Pinheiro

**ABSTRACT:** The parasitic disease neosporosis is responsible for generating economic losses worldwide. An early diagnosis helps to reduce the impact caused by this disease. Detection of circulating IgG antibodies anti – *N. caninum* is an important tool for neosporosis diagnosis. The aim of this study was to standardize the indirect hemagglutination assay for IgG antibodies - *Neospora caninum* detection. We used chicken RBCs under four different treatments, precipitation time was observed as well as RBC amount, and storage durability. After RBCs standardization the conjunction with tachyzoites was made. Seropositivity control serum samples verified by indirect immunofluorescence reaction (RIFI) were used for indirect hemagglutination assay standardization (IHA). Seventy eight cattle blood with different properties were collected for this assay validation, and were subjected to RIFI with a 1: 100 and 1: 200 cut-off and to (IHA 1:16). The RIFI (1: 200) detected 61,3% positivity while IHA detected 67%. The sensitivity and specificity obtained by the developed assay was 64,8% and 41 % respectively. However, when comparing IHA with RIFI (1: 100), the values were 71% and 66,6% for sensitivity and specificity, respectively. IHA designed showed a high correlation ( $p < 0.001$ ) compared to IFA (1: 100. The gold standard test used as the cut-off point and the nature of the antigen used are factors that may be contributing to this result. The hemagglutination developed is an ideal screening test.

**Key-words:** Diagnosis, Hemagglutination, immunofluorescence

1

## 2 1. INTRODUÇÃO

3

4 A neosporose é uma doença parasitária mundialmente conhecida por causar  
5 alterações neuromusculares em cães e induzir abortamentos em bovinos e, em  
6 uma menor escala, em ovinos e caprinos, gerando grandes perdas econômicas na  
7 indústria pecuária (Dubey e Schares, 2011). Estudos quantitativos apontam que as  
8 perdas econômicas, relacionadas com a infecção do hospedeiro intermediário pelo  
9 protozoário *N. caninum*, chegam a mais de um bilhão de dólares por ano (Reichel  
10 et al., 2013). A detecção inicial da neosporose é feita através técnicas de rastreio.  
11 O diagnóstico sorológico constitui um instrumento importante na epidemiologia da  
12 doença, podendo ser utilizado como ferramenta de previsão para identificar animais  
13 infectados e conseqüentemente qual o risco de abortamento (Almería et.al., 2013).

14 Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a detecção de anticorpos anti-  
15 *N. caninum* no soro animal. Entre essas técnicas destacam-se o ensaio  
16 imunoenzimático (ELISA) e suas variações, a reação de imunofluorescência indireta  
17 (RIFI), o PCR e o *immunoblot*. Esses exames, apesar de ter a eficiência  
18 comprovada, apresentam limitações. Sendo assim existe a necessidade do  
19 desenvolvimento de testes de diagnóstico que sejam de baixo custo, elevada  
20 eficácia e que possa ser utilizados em campo para a detecção de imunoglobulinas  
21 específicas.

22 A hemaglutinação indireta é um exame sorológico utilizado para o  
23 diagnóstico de várias doenças. Trata-se de um teste rápido, de fácil execução que  
24 não exige espécie específica de conjugado podendo ser utilizado em várias  
25 espécies animais sem necessidade de modificações e, além disso, possui baixo  
26 custo. A técnica pode ser realizada a campo e, não há necessidade de um  
27 profissional treinado para sua execução. Diante disso objetivou-se com esse  
28 trabalho desenvolver um teste diagnóstico de hemaglutinação indireta, para a  
29 detecção de anticorpos IgG anti- *N. caninum* a fim de constituir um diagnóstico  
30 eficaz rápido e mais acessível ao setor produtivo.

31

32

## 33 2. MATERIAL E METODOS

### 34 2.1 Processamento antigênico

35 Taquizoítos da cepa NC-Bahia (Gondim et al., 2001) foram cultivados em  
36 monocamada de células Vero e mantido com trocas regulares, a cada 48h, de meio  
37 RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5mg/L gentamicina e  
38 5ml/L de anfotericina B em estufa a 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.  
39 Os taquizoítos foram purificados quando a monocamada de célula apresentou um  
40 efeito citopático de aproximadamente 90%. Com o uso do scraper foi feita a  
41 raspagem da monocamada de célula, o conteúdo depositado em tubo falcon e  
42 centrifugado a 1500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado  
43 ressuspense em 3 ml da solução tampão fosfato salino (PBS 7,2 pH). A suspensão  
44 foi recuperada com auxílio de seringa com agulha de 22G para romper as células  
45 intactas e liberar os parasitos. O conteúdo foi filtrado através de um filtro de seringa  
46 de 5µm (Millex Gv, Brasil). A solução foi centrifugada a 1500g durante 10min, e o  
47 precipitado ressuspense em 3ml de formalina tamponada a 10% quando os  
48 taquizoítos foram contados com o auxílio de hemacitômetro.

49

### 50 2.2 Obtenção das hemácias

51 Para obtenção das hemácias foi feita a coleta do sangue de frango com  
52 idade entre 10 a 20 dias, este estava mantido no aviário da Universidade Federal  
53 do Recôncavo da Bahia. O material coletado foi centrifugado a 1500g por 10 min,  
54 o plasma descartado e adicionado cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, no volume duas  
55 vezes maior do que o *pellet* das hemácias e novamente centrifugada a 1500g por  
56 10 min. As hemácias foram lavadas por mais duas vezes utilizando-se esse mesmo  
57 procedimento e então ressuspensas em NaCl 0,9% para uma concentração final  
58 de 0,1% e 1%. As hemácia foram contadas utilizando-se um hemacitômetro.

59

60

61

62

63

## 64 2.3 Padronização da hemaglutinação

65

### 66 2.3.1 Preparo da solução de hemácias

67 Após a contagem, a solução de hemácia foi submetida a 4 diferentes  
68 tratamentos: no tratamento 1 as hemácias foram ressuspensas em 1ml de PBS;  
69 tratamento 2 foram ressuspensas em solução de formalina tamponada 2,8%; no  
70 tratamento 3, em solução de PBS suplementado com 0,5% de soro fetal bovino  
71 (SFB) e no 4, em solução de formalina tamponada a 2,8% e suplementado com  
72 0,5% de SFB. Em uma placa de microtitulação com 96 poços fundo “V” foi  
73 adicionado 25 µl de cada tratamento e 25 µl de PBS (em triplicata), mantida em  
74 temperatura ambiente e observadas a cada 30 minutos até duas horas. Os  
75 tratamentos que obtiveram uma boa precipitação e que não apresentaram hemólise  
76 dos eritrócitos foram testados semanalmente durante dois meses.

77

### 78 2.3.2 Conjugação das hemácias com taquizoitos de *N. caninum*

79 A conjugação ocorreu após a purificação dos taquizoítos e das lavagens das  
80 hemácias como descrito acima. Os taquizoítos foram ressuspensos em 1ml de  
81 PBS, as hemácias tratadas foram centrifugadas a 1500g por 10 min e  
82 ressuspensas nessa solução de taquizoitos sendo, em seguida, utilizadas para a  
83 reação. A solução de hemácias foi conjugada com o antígeno de *N.caninum*  
84 purificados em uma proporção de 1:4 (hemácia:taquizoítos).

85

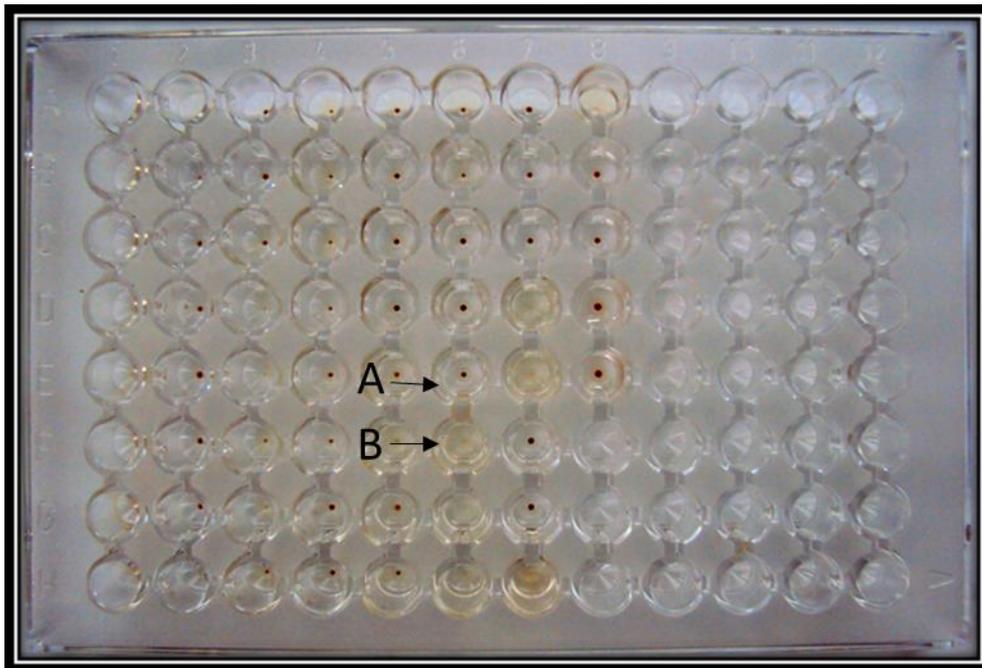
## 86 2.4 Reação de Hemaglutinação

87 Após a conjugação foram feitos testes com amostras de dez soros de bovinos  
88 infectados experimentalmente e com sorologia positivos pela RIFI cedidos pelo  
89 Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Universidade Federal  
90 da Bahia. Além disso, foram colhidas 78 amostras de sangue de vacas leiteiras  
91 provenientes de seis propriedades distribuídas em três municípios da Bahia.

92 O teste foi realizado em placas de microtitulação em poliestireno, com fundo  
93 “V”. Para realização da hemaglutinação os soros foram diluídos a 1:16 e 25µl de  
94 cada diluição distribuídas em diferentes poços. Posteriormente foram adicionados  
95 25 µl da solução de hemácia com taquizoíto. A placa agitada suavemente e

96 incubada a temperatura ambiente. A reação foi observada a cada trinta minutos até  
97 o total de duas horas. A opacidade difusa no diâmetro do poço foi considerada  
98 representativa de uma reação positiva. Enquanto que a reação negativa foi  
99 considerada aquela representada através da formação de um botão compacto de  
100 hemácias no fundo da placa (Figura 1). Os soros positivos no ponto de corte foram  
101 submetidos a diluições seriadas e testados até não apresentarem mais reatividade.  
102 O título foi determinado pela última diluição positiva.

103



104

105 Figura 1: Reação de hemaglutinação para a detecção de anticorpos  
106 IgG anti- *N. caninum* A - Reação negativa e B – Reação positiva.

107

108

## 109 2.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

110 Para a realização da RIFI, cada poço das lâminas de imunofluorescência foi  
111 sensibilizado com 10µl de solução de taquizoíta em uma concentração de 500 a  
112 700 taq/µL. Em seguida as lâminas foram colocadas em estufa a temperatura de  
113 37°C, após a secagem as lâminas foram submersas em metanol, enroladas com  
114 papel alumínio e mantidas a uma temperatura de -20°C até o uso. Para a realização  
115 dos testes as lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente e lavadas em  
116 solução de PBS por 5 minutos, após a lavagem foram colocadas para secar. Os  
117 soros bovino foram diluídos em PBS (7,2 pH) a uma diluição de 1:100 e 1:200.

118 Foram adicionados 10µl em cada poço da lâmina sensibilizada e as lâminas foram  
119 acondicionadas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos. Em seguida, lavadas  
120 duas vezes em PBS por cinco minutos sob agitação e secas a temperatura  
121 ambiente. Posteriormente foram adicionados 10 µl do conjugado anti-IgG bovino  
122 marcado com fluoresceína (anti-IgG bovino conjugado com fluoresceína (FITC)-  
123 Sigma, EUA), diluído em PBS (1:300) e azul de Evans numa concentração final de  
124 0,005%. As mesmas foram incubadas mais uma vez em câmara úmida a 37°C por  
125 40 minutos e lavadas duas vezes em PBS. Após a secagem foram montadas com  
126 glicerina tamponada a 80% e levadas ao microscópio de epifluorescência. Foram  
127 considerados positivas as reações que apresentaram fluorescência total na  
128 superfície dos taquizoítos em mais de 50% do poço. Estas foram testadas em  
129 diluição seriada na razão dois até não apresentarem mais fluorescência.

130

## 131 2.6 Sorologia para Toxoplasmose

132 Foi feita análise de reatividade para *Toxoplasma gondii*, das amostras  
133 coletadas, utilizando o kit comercial Imuno - HAI (WAMA Diagnóstica).

134

## 135 2.6 Análise estatística

136 Com finalidade de avaliar o teste desenvolvido foram analisados a  
137 sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo. Foi calculado  
138 também o qui-quadrado, com objetivo de avaliar a correlação entre o teste de  
139 hemaglutinação desenvolvido e a RIFI.

140

## 141 2.6 Declaração de Ética

142 Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no  
143 Uso de Animais – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, protocolo  
144 23007.014815/2013-34.

145

## 146 5. Resultados

### 147 5.1 Padronização da hemaglutinação

148 A solução de hemácias a 1% demonstrou-se a mais adequada para o teste.  
149 Partindo-se de soluções menos concentradas, o resultado do teste se torna  
150 duvidoso, devido à escassez da mesma. Em concomitância uma solução mais  
151 concentrada exige uma quantidade muito maior de taquizoítos o que dificulta a  
152 conjugação das hemácias devido ao grande número de parasitos necessários. Em  
153 relação aos tratamentos utilizados para proporcionar uma maior estabilidade as  
154 hemácias, a solução contendo formalina tamponada a 2,8% e soro fetal bovino  
155 0,5% foi a que conferiu um melhor resultado com sedimentação bastante visível e  
156 uma durabilidade de 60 dias. No tratamento 1 algumas células hemolisaram e a  
157 sedimentação foi pouco visível. No tratamento 2 o rompimento foi bastante  
158 evidente, não ocorrendo nenhuma sedimentação. O tratamento 3 apresentou  
159 hemossedimentação, entretanto o tempo de durabilidade foi bem menor quando  
160 comparado com o tratamento 4. As hemácias tratadas apenas com PBS e SFB  
161 também demonstraram um bom desempenho pouca durabilidade. O tempo  
162 escolhido para a realização das leituras dos resultados foi o de duas horas

163

### 164 5.2 Sorologia para Toxoplasmose

165

166 Das 78 amostras analisadas uma foi positiva *T. gondii*. Esta foi negativa na  
167 RIFI e positiva na HAI para *N. caninum*.

168

### 169 5.2 RIFI x HAI

170 Anticorpos IgG anti – *N. caninum* foram detectados em 61,3% (54/88) das  
171 amostras de soro pela RIFI (1:200). Das 54 amostras 35 também apresentaram  
172 positividade na HAI. A reação desenvolvida neste trabalho apresentou 19 amostras  
173 negativa a mais que a RIFI (1:200) (Tabela 1), alcançando uma sensibilidade de  
174 64,8% e especificidade de 41%. Os valores preditivo positivo e negativos  
175 encontrados foram 63% e 42% respectivamente.

176

177 Tabela 1: Comparação da reatividade de anticorpos IgG anti- *N. caninum*  
 178 detectados na HAI (1:16) e RIFI (1:200)

		RIFI 1:200		Total
		+	-	
HAI 1:16	+	35	20	55
	-	19	14	33
Total		54	34	88

179

180 Quando a RIFI foi realizada utilizando-se um ponto de corte de 1:100  
 181 observou-se uma soropositividade de 76,1% (67/88) destas 46 foram positivas para  
 182 a HAI (Tabela 2). A sensibilidade e a especificidade foram de 71% e 66,6%. Com  
 183 valor preditivo positivo de 87,2% e negativo de 42%. A Tabela 3 mostra a  
 184 comparação dos resultados. O qui-quadrado revelou diferenças entre o testes de  
 185 HAI e a RIFI (1:200), porém quando comparado com a HAI com a RIFI (1:100)  
 186 revelou uma alta correlação ( $p < 0,001$ ).

187

188 Tabela 2: Comparação da reatividade de anticorpos IgG anti- *N. caninum*  
 189 detectados na HAI (1:16) e RIFI (1:100)

		RIFI 1:100		Total
		+	-	
HAI 1:16	+	48	7	55
	-	19	14	33
Total		67	21	88

190

191

192 Tabela 3: Valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo  
193 (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) obtidos pela comparação da HAI com RIFI  
194 (1:100) e (1:200)

	S	E	VPP	VPN
(1:200)	64,8%	41%	63%	42%
(1:100)	71%	66,6%	87,2%	42%

195

## 196 6. Discussão

197 O presente trabalho desenvolveu um teste de hemaglutinação indireta para  
198 a detecção de anticorpos IgG anti - *Neospora caninum*, para isso foram  
199 determinadas diferentes condições para obtenção de um teste sensível e  
200 específico.

201 No que se refere à padronização das hemácias uma concentração de 1% foi  
202 a mais adequada para produzir o ensaio, devido à facilidade de leitura e uma maior  
203 confiabilidade do resultado. Noah et al. (2009) também obtiveram uma precipitação  
204 e aglutinação adequada para leitura no teste de hemaglutinação indireta adaptado  
205 para o diagnóstico de uma determinada gripe. Sanchez-Ruiz et al. (1985), utilizaram  
206 uma solução de hemácias com concentração próxima a 1% e encontraram  
207 resultados satisfatório no teste de hemaglutinação padronizado para o diagnóstico  
208 da malária. O tratamento com formalina tamponada 2,8% e soro fetal bovino 0,5%  
209 proporcionou uma maior estabilidade as hemácias já que as mesmas não  
210 apresentaram hemólise nesse espaço de tempo estudado.

211 A hemaglutinação padronizada neste estudo apresentou uma sensibilidade  
212 e a especificidade baixa quando comparada com a RIFI no ponto de corte 1:200.  
213 Entretanto, ao fazer a RIFI num ponto de corte de 1:100 observa-se uma mudança  
214 nesses valores, fazendo com que a sensibilidade e especificidade do HAI proposto  
215 sejam elevadas. O valor preditivo positivo aumentou de 63% (RIFI 1:200) para  
216 87,2%( RIFI 1:100) esses valores refletem diretamente na probabilidade de  
217 resultado falso positivo, uma vez que quanto maior o VPP menor será a chance de  
218 encontrar amostras positivas sem que o animal apresente anticorpos específicos.  
219 O ponto de corte utilizado na RIFI influencia diretamente nos valores obtidos. A

220 redução na diluição resultou em um maior número de amostras positivas na RIFI,  
221 estas amostras já tinham apresentado positividade para IgG anti-*Neospora*  
222 *caninum* na HAI. A diminuição no ponto de corte aumentou o número de animais  
223 positivos e em consequência o testes passaram a ter uma alta correlação. As  
224 diluições do soro variam de acordo com o estudo. Camillo et al. (2010) utilizam uma  
225 diluição inicial de 1:100 para bovinos já Guedes et al. (2008) e Martins et al. (2011)  
226 utilizam diluição de 1:200. Em bovinos adultos os níveis de anticorpos específicos  
227 variam de acordo com a idade do animal e do estado de gravidez (Davison et al.,  
228 1999). Segundo Alvarez-Garcia et al. (2003) a RIFI como padrão ouro não é  
229 suficientemente precisa em um estudo de validação, uma vez que ainda há  
230 algumas incertezas a respeito do ponto corte padrão. Pinheiro et al (2005)  
231 verificaram que ao diminuir a o ponto de corte da RIFI de 1:50 para 1:25, ao propor  
232 um Dot-ELISA para cães os valores da sensibilidade e especificidade foram  
233 alterados, permitindo afirmar que os resultados pelo obtidos pode está diretamente  
234 relacionado ao ponto de corte utilizado na RIFI. Por ser um teste altamente sensível  
235 e específico capaz de detecção pequenas frações proteicas do agente, sugere a  
236 utilização do immunoblotting como técnica complementar para a confirmação dos  
237 teste sorológicos (Canada et al., 2004; Ghalimi et al, 2014). Staubli et al. (2006)  
238 utilizaram o immunoblotting para complementar o ELISA tradicional e verificaram  
239 que a reatividade do anticorpos era detectados mais cedo do que no ELISA.

240 É importante ressaltar que RIFI, apesar de ser utilizado como padrão ouro  
241 para a detecção de anticorpos IgG anti – *N. caninum*, é um teste que emprega um  
242 número maior de passos que a reação de hemaglutinação, assim como, mais  
243 reagentes, aumentando as possibilidades de erros técnicos. A leitura é difícil,  
244 necessitando que o observador tenha prática na realização desse teste. Dessa  
245 forma, há necessidade de que o equipamento esteja bem ajustado e o técnico bem  
246 treinado (Ferreira e Ávila, 2001). Em contraste a hemaglutinação indireta que  
247 possui uma fácil interpretação evitando um resultado falso positivo e negativo. Os  
248 testes de aglutinação tem sido utilizado na detecção de algumas parasitoses devido  
249 a sua praticidade

250 Além disso, outros aspectos também podem ter influenciado o resultado.  
251 Sabe-se que a natureza do antígeno utilizado e a possível ocorrência de reações  
252 cruzadas com outros coccídeos podem interferir no resultado. A ocorrência de uma  
253 amostra positiva para *T. gondii*, sendo esta negativa da RIFI e positiva na HAI, pode

254 ser indicativo de reação cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii*. Apesar dos  
255 antígenos totais se aderirem bem à superfície das hemácias sem um tratamento  
256 prévio, uma sensibilidade maior pode ser alcançada ao se utilizar antígenos  
257 proteicos ou recombinados (Ferreira e Ávila, 2001). Sasaki et al., 1996 encontrou  
258 uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 98% ao utilizar um extrato  
259 proteico na padronização da reação de hemaglutinação para doença de Chagas.  
260 Ghalmi et al. (2014) utilizando antígeno recombinado de *N. caninum* mostraram que  
261 a aglutinação em látex não apresentou diferença significativa da RIFI. Dong et al.  
262 (2012) e He et al. (2013) também desenvolveram testes sorológico sensível e  
263 específico utilizando recombinantes.

264 Em geral o método desenvolvido neste trabalho é um teste rápido, de fácil  
265 execução e baixo custo sendo ideal como um teste de triagem podendo ser utilizado  
266 para grandes quantidades de amostras a campo, nas condições apresentadas.

267

268

269

270

271

## Referência Bibliográficas

ALMERIA, F.; LOPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Research in Veterinary Science*, v. 30, p.1-7, 2013.

CAMILLO, G.; CADORE, G.; CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; BRÄUNIG, P.; SANGIONI, L. A.; F.VOGEL, F.S.F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.6, p.1511-1513, 2010.

DAVISON H.C.; GREINER M.; TREES A.J. Quantitative Analysis of *Neospora caninum* serological data obtained from dairy cattle. Proceedings Of the society of veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Annual Conference, Bristol, UK, 1999, p. 172-181.

DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; KOHSAKA, T; IKE, N; ENOCH, Y. Development of Two Murine Antibodies against *Neospora caninum* Using Phage Display Technology and Application on the Detection of *N. caninum*. *BMC Biotechnology*, v.12, n.19, p. 7-9, 2012.

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

FERREIRA, A W; ÁVILA, S L M. Diagnóstico de Laboratório das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação Clínico-Laboratorial. 2º. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.

GHALMI, F.; CHINA, B.; JENKINS, M.; AZZAG, N.; LOSSON, B. Comparison of different serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and canine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.26, n.1, p. 136-140, 2014.

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

GUEDES, M.H.P.; GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M.; HIRSCH, C. Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in cows and fetuses from Municipalities of Southern Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 4, p. 189-194, 2008.

HE, P.; LI, J.; GONG, P.; LIU, C.; ZHANG, G.; YANG, J.; TUO, W., YANG. B.; ZHANG, X. *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattle neosporosis. *Parasitology Res.*, v.112, p. 2117-2120, 2013.

MARTINS, N. E. X.; FRESCHI, C. R.; BAPTISTA, F.; MACHADO, R. Z.; FREITAS, F. L. C.; ALMEIDA, K. S. Ocorrência de anticorpos Anti-*Neospora caninum* em

vacas lactantes do município de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v.40, n.3, p. 231-238, 2011.

NOAH, D.L.; HILL, H.; HINES, D.; WHITE, E. L.; WOLFF, M.C. Qualification of the Hemagglutination Inhibition Assay in Support of Pandemic Influenza Vaccine Licensure. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, n.4, p. 558–566, 2009.

PINHEIRO, A.M.; COSTA, M.F.; PAULE, B.; VALE, V.; RIBEIRO, M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R. E.; ALMEIDA, M. A. O.; MEYER, R.; FREIRE, S. M. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot- ELISA. *Veterinary Parasitology*, v. 130, p. 73-79, 2005.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, A. M.; GONDIM, L.F.P.; ELLIS, J.T.; What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. *International Journal for Parasitology*, v. 43, p. 133-142, 2013.

SANCHEZ-RUIZ, M.C.A; CAMARGO, M.E; CENEVIVA, A. C; FERREIRA, A. W. Teste de hemaglutinação na sorologia da malária humana empregando hemácias parasitadas pelo *Plasmodium berghei*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.18, p. 85-93, 1985

SASAKI, A. T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; NAKAMURA, P. M.; VAZ, A. J.; CAMARGO, E. C.; SILVA, M. V. Sorodiagnóstico da doença de chagas: novo reagente para o teste de hemaglutinação Indireta (THAI). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.29, n.2, p. 137-144, 1996.

STAUBLI, D.; NUNES, S.; SAGER, H.; SCHARES, G.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. *Parasitol Res* v.99, p.648–658, 2006.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste sorológico para detecção de anticorpos IgG anti-*N.caninum* foi padronizado conseguindo uma sensibilidade e especificidade de 64,8% e 41% quando comparado com a RIFI (1:200) e 71% e 66,6 % RIFI (1:100). A HAI desenvolvida não apresentou diferenças significativas com a RIFI (1:100). Diante dos resultados obtidos, essa técnica pode ser utilizada, nas condições apresentadas, como teste de rastreio de anticorpos IgG anti-*N. caninum*, se houver a necessidade de comparação com a RIFI sugere a utilização do ponto de corte de 1:100.