

IMUNODIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE EM CÃES

BERNE, Natália¹; PINHEIRO, Amanda²; ANDREOTTI, Renato³; CAPELLA, Gabriela de Almeida¹; LEITE, Fábio Pereira Leivas⁴.

¹Universidade Federal de Pelotas, Medicina Veterinária;

²Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, RS;

³EMBRAPA Gado de Corte, BR 262, km 4, CP 154, Campo Grande, MS;

⁴Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, RS.
*nattypel@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Uma das causas de importantes perdas econômicas na pecuária em todo o mundo é a parasitose causada pelo protozoário *Neospora caninum* agente da neosporose. Este parasita foi motivo de muitos estudos que comprovaram a sua relação com o aborto em bovinos, que, assim como os ovinos e outros mamíferos, participam do ciclo de vida do *N. caninum* como hospedeiros intermediários. O hospedeiro definitivo, e mais importante para que se mantenha a alta prevalência de neosporose nos rebanhos bovinos de todo mundo, é o cão doméstico.

O parasito na forma de taquizoíto caracteriza a forma aguda da infecção, podendo ser encontrado em células nervosas, macrófagos, células endoteliais vasculares, miócitos, células epiteliais tubulares renais, hepatócitos, coração, pulmão, rins e placenta (DUBEY, 1999). Quando na forma de bradizoítos, caracteriza a cronicidade da infecção e está presente, geralmente no tecido nervoso dos hospedeiros intermediários e raramente em tecido muscular (PETERS et al., 2001).

O oocisto somente é liberado pelo hospedeiro definitivo e, após esporulação, torna-se infectante para os hospedeiros intermediários (McALLISTER et al., 1998) que podem pertencer a espécies silvestres e domésticas. A infecção do hospedeiro intermediário bovino pode ocorrer por transmissão vertical, tendo sido sugerida como a principal via de transmissão nos rebanhos (BJÖRKMAN et al., 1996).

Estudo da antigenicidade do parasito sugeriu que os antígenos mais específicos encontram-se na superfície celular de *N. caninum* e testes sorológicos que possuem como alvo estes antígenos apresentam menor percentual de reações cruzadas com parasitos do mesmo filo (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999). Nesta perspectiva, os antígenos protéicos imunodominantes de taquizoítos, p29, p35 e p43 (HOWE et al., 1998), assim como outros alvos protéicos presentes na superfície de *N. caninum* são importantes para desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para neosporose em amostras clínicas de animais.

Para que seja feita a identificação da doença na população bovina e canina, estudos sorológicos foram realizados em diferentes países, tendo sido relatadas taxas de prevalências variando de 10 a 60% (DUBEY et al., 2007).

O objetivo do presente estudo foi verificar se a proteína recombinante NcSRS2 de *N. caninum* expressa em *P. pastoris* é reconhecida em ELISA por anticorpos de cães naturalmente infectados por *N. caninum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste experimento soros de cães coletados de áreas endêmicas da neosporose no Rio Grande do Sul.

O sangue periférico foi coletado da veia jugular de 65 cães adultos usando uma agulha 22 g anexado ao Vacutainer tubos (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ). O sangue permaneceu à temperatura ambiente para a formação de coágulos, centrifugado por 10min a 2000g para separação de soro, e armazenado a -20 °C até sua utilização.

O antígeno utilizado no ELISA indireto foi a proteína recombinante NcSRS2 de *Neospora caninum* produzida em *P. pastoris*, conforme descrito por Pinheiro et al (2011). O teste de ELISA foi realizado conforme descrito a seguir: placas de poliestireno de 96 poços de microtitulação (Polysorp Nunc, EUA) foram sensibilizadas durante a noite a 4 °C com 50 ng / poço de proteína recombinante NcSRS2 em 0.05-M tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As placas foram então lavadas três vezes com PBS 0,01 M com 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueado com de 0,01 M PBS com leite desnatado 5% a 37 °C por 1 h. Após três lavagens com PBS-T, as amostras de soro positivo e negativo e soros de controle, todos em duplicata, foram diluídas a 1:100 em 0,01 M PBS-T e incubadas a 37 °C por 1 h. Após três lavagens, 100 mL / poço do conjugado IgG anti-canino ligado a peroxidase diluída a 1:4000 em 0,01 M PBS-T, seguido por incubação a 37 °C por 1 h. Após mais cinco lavagens, 100mL do substrato (o-fenilenodiamina dicloridrato; comprimidos OPD, Sigma Chemicals, EUA) em fosfato citrato-tampão (0,4 mg / mL), contendo 0,04% de 30% (v / v) de peróxido de hidrogênio, pH 5.0, foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 min. A reação enzimática foi parada após quinze minutos pela adição H₂SO₄ 1N (50uL/orifício).

Os resultados de absorvância obtidos foram lidos em espectrofotômetro para microplacas (TermoPlate), com comprimento de onda de 492nm. Os soros positivos e negativos, bem como os testados foram avaliados em duplicata.

Para avaliar com precisão a especificidade do diagnóstico e sua sensibilidade, os resultados dos 65 soros caninos, com amostras positivas e negativas, foram submetidas a Receiver Operating Characteristic (ROC) e confirmada por análise estatística usando software MedCalc (versão 10.3.0.0) (www.medcalc.be).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos realizados juntamente a este trabalho confirmaram através de SDS-PAGE e *Western Blot* que *P. pastoris* expressou a proteína recombinante. Como a rNcSRS2 foi reconhecida por soros de animais (caninos) naturalmente infectados e comprovados por imunofluorescência indireta (IFI), sugere que a mesma manteve a configuração da proteína natural do protozoário, demonstrando ser antigênica.

Na Fig. 1 observamos os resultados do ELISA com a rNcSRS2 dos caninos testados frente a essa proteína recombinante através do teste ROC, onde se verificou 21 soros positivos e 44 soros negativos.

Há uma necessidade de um ensaio padronizado de diagnóstico para a detecção de *N. caninum* em espécies afetadas por neosporose, principalmente nas populações de cães, visto a sua importância epidemiológica na transmissão horizontal desta parasitose.

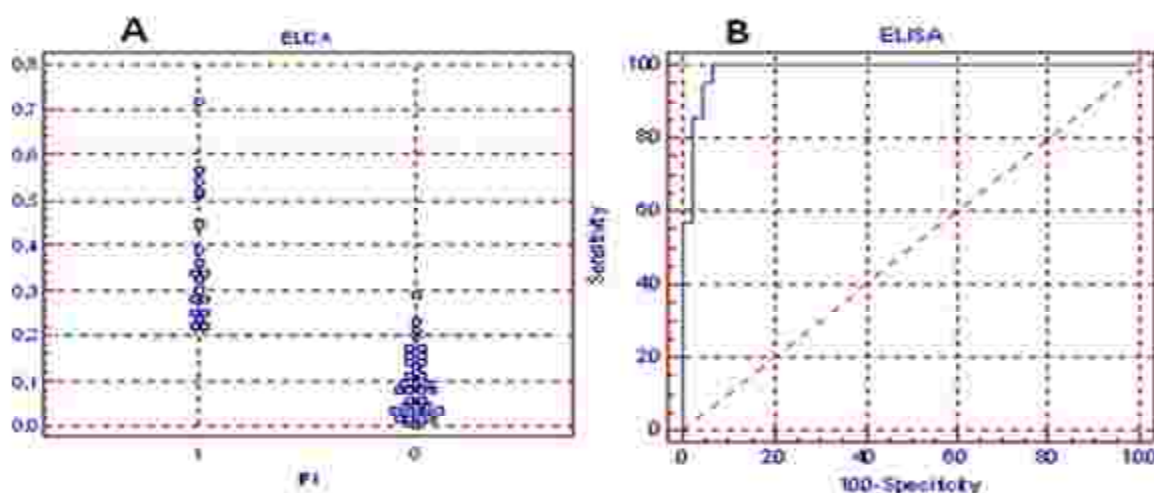


Figura 1: ROC análise. Resultados do ELISA-NcSRS2 de soros caninos apresentando 21 positivos e 44 negativos, que foram confirmados pela IFAT. (A) Distribuição de freqüência dos soros, (1) positivos e (0) negativos. As amostras foram consideradas positivas quando os valores de corte foram maiores ou iguais a 0,21 ELISA valores médios de absorbância. (B) enredo ROC. Área sob a curva = 0,986 (0,018); intervalo de confiança 95% entre 0,919 e 0,997.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, observamos que a proteína rNcSRS2 de *N. caninum* expressa em *P. pastoris* foi capaz de ser reconhecida pelos anticorpos de cães domésticos, importante hospedeiro intermediário, sugerindo que este é um antígeno promissor para ser utilizado em imunodiagnóstico. Agradecemos ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

5 REFERÊNCIAS

- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal Parasitology**, v.29, p.1497-1507, 1999.
- BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STENLUND, S. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p.1441-1444, 1996.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.349-367, 1999.
- HOWE, D. K.; CRAWFORD, A. C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L. D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.66, n.11, p.5322-5328, 1998.
- McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.
- PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscle of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1114-1148, 2001.