

SOROS DE CÃES E BOVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *NEOSPORA CANINUM* E TESTADOS COM ANTÍGENOS DE *N. CANINUM* E *N. HUGHESI*

GONDIM, L. F. P. ^{1,*}, LINDSAY, D. S. ², MCALLISTER, M. M. ³

¹ Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Av. Ademar de Barros 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil, 40170-110.

² Center for Molecular Medicine and Infectious Diseases, Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia 24061-0342.

³ University of Illinois, Department of Veterinary Pathobiology, 2001 South Lincoln Avenue, Urbana, Illinois 61802.

Resumo

Neospora caninum é um protozoário parasita que infecta um grande espectro de animais doméstico e silvestres, sendo um importante causador de abortamento em bovinos, além de provocar alterações neuromusculares em outros animais. Cães e coiotes são hospedeiros definitivos de *N. caninum*, os quais podem excretar oocistos do parasito nas fezes. *Neospora hughesi* é um protozoário associado com mieloencefalite em equinos, cujo hospedeiro definitivo ainda é desconhecido. O objetivo deste estudo foi investigar se soros de animais infectados experimentalmente com *N. caninum* exibem reatividade cruzada quando testados com antígenos de *N. caninum* e *N. hughesi* em testes de imunofluorescência indireta (IFI). Noventa e quatro amostras (47 pré-infecção e 47 pós-infecção com *N. caninum*) de cães, bezerros e vacas foram testadas pela IFI. Todas as 47 amostras pré-infecção para *N. caninum*, incluindo 10 soros caninos, 20 soros de bezerros e 17 soros de vacas, foram negativas para *N. caninum* e *N. hughesi*. Todas as 47 amostras pós-infecção, foram positivas para *N. caninum* e *N. hughesi*, embora as reações para *N. hughesi* apresentaram normalmente positividade em uma menor diluição ($p < 0.02$). Portanto, inquéritos sorológicos para a detecção de animais infectados com *N. hughesi* podem gerar resultados incorretos devido a reações cruzadas com *N. caninum*.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário que acomete uma grande variedade de espécies animais domésticas e silvestres (Anderson et al., 1991; Woods et al., 1994; Barber and Trees, 1996; Gondim et al., 2004a; Huang et al., 2004), estando comumente associado com abortamentos em bovinos (Dubey, 2003). O parasito foi classificado em 1988 como a primeira espécie do gênero *Neospora*, classificação esta baseada em características morfológicas e antigênicas de estágios assexuados do protozoário (taquizoítos e bradizoítos encistados) em cães infectados. Dez anos após sua classificação, descobriu-se que cães eram hospedeiros definitivos do parasito (McAllister et al., 1998). Posteriormente, coiotes (*Canis latrans*) também foram identificados como hospedeiros definitivos de *N. caninum* (Gondim et al., 2004c).

Um organismo semelhante a *N. caninum*, isolado de um equino com mieloencefalite (Marsh et al., 1996), foi classificado como uma nova espécie, *Neospora hughesi*, baseado em características moleculares, antigênicas e estruturais, quando comparado com *N. caninum* (Marsh et al., 1998). Em relatos posteriores, importantes antígenos de *N. caninum* e *N. hughesi*, SAG1, SRS2, GRA6, and GRA7 foram comparados e confirmados como sendo diferentes (Marsh et al., 1999; Dubey et al., 2001; Walsh et al., 2001). Camundongos, equinos e coelhos, apresentaram reatividade sorológica cruzada com *N. caninum* (Dubey et al. 2001; Marsh et al. 1998; Packham et al. 2002; Hoane et al. 2005), e um coelho infectado com *N. caninum* mostrou reatividade cruzada com *N. hughesi* (Packham et al, 2002).

Estudos sorológicos para a detecção de animais infectados com *Neospora* spp. têm sido relatados por vários autores (Cheadle et al., 1999; Vardeleon et al., 2001; Gupta et al., 2002; Packham et al., 2002; Dubey et al., 2003; Pitel et al., 2003). Nesses estudos não é possível a determinação do número exato de animais infectados com *N. hughesi* ou *N. caninum*. ELISAs recombinantes baseados nos antígenos de superfície de 29-KDa de *N. caninum* (rNc-SAG1) (Howe et al., 2002) e de *N. hughesi* (rNh-SAG1) (Hoane et al., 2005) têm sido desenvolvidos. Esses ELISAs exibiram elevadas especificidades e sensibilidades, contudo observou-se reatividade cruzada entre *N. caninum* e *N. hughesi* (Hoane et al., 2005).

O objetivo do estudo corrente foi investigar se cães, bezerros e vacas infectados experimentalmente com *N. caninum*, exibem diferenças significativas quando examinados por meio de testes de imunofluorescência indireta (IFI) com antígenos de *N. caninum* e *N. hughesi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de soro

Foram obtidas amostras de soro de bezerros, vacas e cães, os quais haviam sido infectados experimentalmente com *N. caninum* entre os anos de 2000 e 2004 na Universidade de Illinois em Urbana-Champaign. Quarenta amostras de soro, incluindo 20 amostras pré-infecção e 20 pós-infecção, foram obtidas de bezerros recém-nascidos, infectados por via endovenosa com taquizoítos, ou inoculados oralmente com oocistos esporulados de *N. caninum* (Gondim et al., 2002; Gondim et al., 2004c). Vinte amostras de soros de cães (10 pré-infecção e 10 pós-infecção) foram obtidas de animais que consumiram tecidos infectados com *N. caninum* (Gondim et al., 2002; Gondim et al., 2005). Trinta e quatro soros de vacas, consistindo de 17 pré-infecção e 17 pós-infecção, foram obtidos de vacas inoculadas oralmente com oocistos esporulados de *N. caninum* (Gondim et al., 2004b).

Parasitas

Taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-beef) (McAllister et al., 2000) e *N. hughesi* (Nh-A1 strain) (Walsh et al., 2001) foram cultivados em células Vero com RPMI contendo L-Glutamine, suplementada com 5% de soro equino, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Os taquizoítos eram removidos quando cerca de 80% das monocamadas com células estavam infectadas. As suspensões de células infectadas eram passadas em seringas com agulhas de 26G, suspensas em PBS e purificadas em filtros de 5 µm. O filtrado era lavado três vezes por centrifugações (1200 g por 10 min) em PBS e o sedimento era suspenso para uma concentração final de 500 a 1000 taquizoítos/µl. Os taquizoítos purificados eram distribuídos em lâminas de 12 poços revestidas com, secadas em temperatura ambiente e fixadas por 5 min em metanol. As lâminas com antígeno eram estocadas à -20°C até a realização dos testes.

Imunofluorescência indireta

As amostras de soro foram testadas simultaneamente para *N. caninum* e *N. hughesi*, empregando-se lâminas com antígeno estocadas à -20°C por 1 a 5 semanas. Soros de cães e bezerros foram triados a 1:50 em PBS e os soros de vacas foram testados em 1:200. Os títulos para ambos os parasitos foram determinados em todas as amostras positivas, por meio de diluições séricas dobradas. Anticorpos anti-IgG bovino e anti-IgG canino conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (Bethyl, Montgomery, Texas) foram utilizados como conjugados para os soros bovinos e caninos respectivamente.

Estatística

O teste de Wilcoxon foi empregado para a comparação dos títulos dos soros entre as amostras de cães, bezerros e vacas, utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Foram utilizadas nesse estudo 94 amostras de soros de cães, bezerros e vacas, incluindo 47 amostras pré-infecção, e 47 amostras pós-infecção, colhidas após exposição à *N. caninum* (taquizoítos, bradizoítos ou oocistos). As 47 amostras pré-infecção para *N. caninum*, incluindo 10 soros de cães, 20 de bezerros e 17 de vacas, testaram negativas para *N. caninum* e *N. hughesi*. Todos os soros de animais infectados com *N. caninum* resultaram em positivos na IFI com antígeno de *N. hughesi*; contudo, os títulos séricos para *N. caninum* foram significativamente maiores ($P < 0.02$; normalmente 1 diluição diferente) do que os títulos para *N. hughesi* nos cães, bezerros e vacas (Tabela I). Os títulos séricos para bezerros, vacas e cães variaram de 100-25600, 400-6400 e 100-1600, respectivamente, ao passo que os títulos obtidos empregando-se na IFI antígeno de *N. hughesi* variaram de 50-12800, 200-3200 e 50-800 para bezerros, vacas e cães respectivamente (Tabela II).

Table I. Reatividade cruzada de soros de animais infectados com *Neospora caninum*, avaliada por meio de testes de imunofluorescência indireta.

	Soros					
	Pré-infecção com <i>N. caninum</i>			Pós-infecção com <i>N. caninum</i>		
	Dog	Calf	Cow	Dog	Calf	Cow
Número de animais	10	20	17	10	20	17
Animais soropositivos para <i>N. caninum</i>	0	0	0	10	20	17
Animais seropositivos para <i>N. hughesi</i>	0	0	0	10	20	17
Animais com títulos de <i>N. caninum</i> maiores que <i>N. hughesi</i>	-	-	-	8*	17*	12*
Animais com títulos de <i>N. hughesi</i> maiores que <i>N. caninum</i>	-	-	-	0	0	0

* $P < 0.02$

Table II. Títulos de anticorpos de bezerros, vacas e cães infectados experimentalmente com *Neospora caninum*, determinados por meio de testes de imunofluorescência indireta empregando-se antígenos de *N. caninum* e *N. hughesi*

Antibody titers	Imunofluorescent Antibody Tests					
	For <i>N. caninum</i>			For <i>N. hughesi</i>		
	Calves	Cows	Dogs	Calves	Cows	Dogs
50	0	*	0	1	*	1
100	1	*	1	1	*	1
200	0	0	2	2	3	4

400	3	5	1	2	5	0
800	2	4	3	2	5	4
1600	2	4	3	2	1	0
3200	3	3	0	5	3	0
6400	5	1	0	4	0	0
12800	2	0	0	1	0	0
25600	2	0	0	0	0	0

* Não testados nas referidas diluições

DISCUSSÃO

O presente estudo reforça o potencial de ocorrência de reatividade cruzada entre *N. caninum* e *N. hughesi* nos testes sorológicos, que gera confusão na interpretação e confiança nos resultados quando um dos parasitos é investigado individualmente. Essa é a primeira vez que soros de cães ou bovinos, experimentalmente infectados com *N. caninum*, são testados empregando-se *N. caninum* e *N. hughesi* como antígenos. Sorologia para o protozoário *Hammondia heydorni* não foi incluída neste experimento, pois não há teste sorológico disponível para a detecção de anticorpos contra este parasito.

Este estudo também evidencia que soros obtidos após a infecção com *N. caninum* em bovinos e cães, testados simultaneamente na IFI para *N. caninum* e *N. hughesi*, exibiram títulos mais elevados quando *N. caninum* foi empregado como antígeno. Embora os títulos de anticorpos séricos tenham sido maiores empregando-se antígeno de *N. caninum* ($P < 0.02$), houve ao mesmo tempo, reatividade cruzada significativa com *N. hughesi* ($P < 0.001$). Portanto, confirma-se aqui que inquéritos sorológicos para *N. hughesi* podem ser confundidos caso os animais estudados tenham anticorpos anti-*N. caninum*. Embora não tenha sido testado o oposto (títulos para *N. caninum* em animais infectados com *N. hughesi*), parece ser provável que existe a mesma possibilidade de reatividade cruzada nos testes, o que potencialmente gera resultados falso-positivos na sorologia para *N. caninum*.

Packham et al. (2002) compararam diferentes técnicas sorológicas (IFI, ELISA e DAT) empregando-se soros de equinos infectados experimentalmente com *N. hughesi* e concluíram que a IFI foi o único teste, entre os estudados, que permitiu uma discriminação entre equinos infectados e não infectados. Recentemente foi desenvolvido um ELISA para *N. hughesi* a partir do antígeno SAG1 recombinante (Hoane et al., 2005); este teste apresentou maior especificidade do que os anteriores, contudo, falhou em discriminar entre animais infectados com *N. caninum* e *N. hughesi*.

Infecção natural com *N. hughesi* não tem sido confirmada em outras espécies animais além de equinos. Esse fato não exclui a possibilidade que *N. hughesi* infecte diferentes espécies animais domésticas e silvestres. É também esperado que o hospedeiro definitivo de *N. hughesi*, o qual até hoje é desconhecido, seja alguma espécie animal carnívora largamente distribuída. É razoável especular que numerosos estudos sorológicos para a identificação de animais infectados com *N. caninum* tenha sido confundido com *N. hughesi*. Um outro fator de confusão é a ocorrência de infecções pelo protozoário *Hammondia heydorni*, o qual é muito próximo filogeneticamente de *Neospora* sp (Ellis et al., 1999), e ainda não pode ser investigado sorologicamente devido a inexistência de teste sorológico para essa espécie. Portanto, até o momento, não é possível a diferenciação sorológica entre infecções causadas *N. hughesi*, *N. caninum* e *H. heydorni*. A diferenciação entre os três parasitos é possível quando DNA dos mesmos é obtido (Marsh et al., 1998; Ellis et al., 1999; Slapeta et al., 2002). Estudos adicionais

são necessários para a elaboração de técnicas sorológicas capazes de diferenciar infecções causadas por *N. hughesi*, *N. caninum* e *H. heydorni*.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo foi financiado pelo USDA (United States Department of Agriculture) sob o gerenciamento da University of Illinois (ILLU-70-0341). Luís F. P. Gondim recebeu, no momento da execução do experimento, bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M. L., P. C. Blanchard, B. C. Barr, J. P. Dubey, R. L. Hoffman, and P. A. Conrad. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **198**: 241-244.
- Barber, J. S., and A. J. Trees. 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record* **139**: 439-443.
- Cheadle, M. A., D. S. Lindsay, S. Rowe, C. C. Dykstra, M. A. Williams, J. A. Spencer, M. A. Toivio-Kinnucan, S. D. Lenz, J. C. Newton, M. D. Rolsma, and B.L. Blagburn. 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterisation of an isolate recovered from a naturally infected horse [corrected]. *International Journal for Parasitology* **29**: 1537-1543.
- Dubey, J. P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology* **41**: 1-16.
- _____, Carpenter, J. L., C. A. Speer, M. J. Topper, and A. Uggla. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **192**: 1269-1285.
- _____, Liddell, S., D. Mattson, C. A. Speer, D. K. Howe, and M. C. Jenkins. 2001. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *Journal of Parasitology* **87**: 345-353.
- _____, Mitchell, S. M., J. K. Morrow, J. C. Rhyhan, L. M. Stewart, D. E. Granstrom, S. Romand, P. Thulliez, W. J. Saville, and D. S. Lindsay. 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. *Journal of Parasitology* **89**: 716-720.
- Ellis, J. T., D. A. Morrison, S. Liddell, M. C. Jenkins, O. B. Mohammed, C. Ryce, and J. P. Dubey. 1999. The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology* **118**: 357-362.
- Gondim, L. F. P., M. M. McAllister, and L. Gao. 2005. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology* **134**: 33-39.
- _____, L. Gao, and M. M. McAllister. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology* **88**: 1159-1163.
- _____, M. M. McAllister, N. E. Mateus-Pinilla, W. C. Pitt, L. D. Mech, and M. E. Nelson. 2004. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology* **90**: 1361-1365.
- _____, M. M. McAllister, R. C. Anderson-Sprecher, C. Bjorkman, T. F. Lock, L. D. Firkins, L. Gao, and W.R. Fischer. 2004. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology* **90**: 1394-1400.

_____, M. M. McAllister, W. C. Pitt, and D. E. Zemlicka. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* **34**: 159-161.

Gupta, G. D., J. Lakritz, J. H. Kim, D. Y. Kim, J. K. Kim, and A.E. Marsh. 2002. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. *Veterinary Parasitology* **106**: 193-201.

Hoane, J. S., M. R. Yeargan, S. Stamper, W. J. Saville, J. K. Morrow, D. S. Lindsay, and D. K. Howe. 2005. Recombinant NhSAG1 ELISA: a sensitive and specific assay for detecting antibodies against *Neospora hughesi* in equine serum. *Journal of Parasitology* **91**: 446-452.

Howe, D. K., K. Tang, P. A. Conrad, K. Sverlow, J. P. Dubey, , and L. D. Sibley. 2002. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**: 611-615.

Huang, C. C., C. H. Yang, Y. Watanabe, Y. K. Liao, and H. K. Ooi. 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Research* **35**: 283-290.

Marsh, A. E., B. C. Barr, J. Madigan, J. Lakritz, R. Nordhausen, and P.A. Conrad. 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **209**: 1907-1913.

_____, B. C. Barr, A. E. Packham, and P.A. Conrad. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *Journal of Parasitology* **84**: 983-991.

_____, D. K. Howe, G. Wang, B. C. Barr, N. Cannon, and P.A. Conrad. 1999. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. *International Journal for Parasitology* **29**: 1575-1582.

McAllister, M. M., C. Bjorkman, , R. Anderson-Sprecher, and D. G. Rogers. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **217**: 881-887.

_____, J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills, and A. M. McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* **28**: 1473-1478.

Packham, A. E., P. A. Conrad, W. D. Wilson, L. V. Jeanes, K. W. Sverlow, I. A. Gardner, B. M. Daft, A. E. Marsh, B. L. Blagburn, G. L. Ferraro, and B. C. Barr. 2002. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. *Journal of Parasitology* **88**: 1239-1246.

Pitel, P. H., S. Romand, S. Pronost, , N. Foucher, G. Gargala, K. Maillard, P. Thulliez, C. Collobert-Laugier, D. Tainturier, G. Fortier, and J. J. Ballet. 2003. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Veterinary Parasitology* **118**: 1-6.

Slapeta, J. R., B. Koudela, J. Votypka, D. Modry, R. Horejs, and J. Lukes. 2002. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *Veterinary Journal* **163**: 147-154.

Vardeleon, D., A. E. Marsh, J. G. Thorne, W. Loch, R. Young, and P.J. Johnson. 2001. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. *Veterinary Parasitology* **95**: 273-282.

Walsh, C. P., R. Vemulapalli, N. Sriranganathan, A. M. Zajac, M. C. Jenkins, and D.S. Lindsay. 2001. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* **31**: 253-258.

Woods, L. W., M. L. Anderson, P. K. Swift, and K. W. Sverlow. 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Journal of the Veterinary Diagnostic Investigation* **6**: 508-510.