

Teste Sorológico de Imunofluorescência Indireta para o Diagnóstico da Neosporose em Bovinos

Renato Andreotti¹
Maria de Fátima Cepa Matos²
Jacqueline Marques de Oliveira³
Rosângela Locattelli-Dittrich⁴

A neosporose é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, um parasita intracelular obrigatório pertencente ao *phylum* Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (Dubey et al., 2002). *N. caninum* tem como hospedeiro definitivo o cão, e como hospedeiros intermediários os bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, cervos e outros animais (Dubey & Lindsay, 1996).

Durante a última década, a infecção por *N. caninum* despontou como uma doença reprodutiva de bovinos, com distribuição mundial (Venturini et al., 1999; Hemphill et al., 2000; Reichel, 2000; Sawada et al., 2000; Dijkstra et al., 2003), causando principalmente abortos em rebanhos bovinos (Anderson et al., 2000), com importância econômica atribuída principalmente aos custos associados ao aborto; ao valor dos fetos; à inseminação artificial ou à cobertura; à diminuição da produção de leite; ao aumento do descarte e à reposição dos animais descartados em função dessa enfermidade (Boger & Hattel, 2003).

No Brasil, a neosporose tem sido registrada em diferentes Estados da federação, tais como: Rio Grande do Sul (Corbelini et al., 2002), Paraná (Locattelli-Dittrich et al., 2001), Mato Grosso do Sul (Andreotti et al., 2003) e Bahia (Gondin et al., 2001).

As infecções congênicas ocorrem nos bovinos leiteiros e de corte, com maior número de casos nos rebanhos leiteiros. As vacas leiteiras soropositivas produzem menos leite e são descartadas mais cedo, diminuindo a vida produtiva (Moore et al., 2002). Nos bovinos de corte soropositivos há um maior risco de abortos e natimortos, além do aumento do descarte por problemas reprodutivos (McAllister, 1999).

A transmissão vertical parece ser a principal via de infecção de *Neospora* nos rebanhos bovinos de áreas endêmicas. Nos rebanhos endemicamente infectados, com acompanhamento extensivo, a sorologia demonstrou que pode ocorrer um baixo nível de infecção pós-natal, de origem ainda desconhecida (Baillargeon et al., 2001).

¹ Médico-Veterinário, Ph.D., CRMV-MS Nº 510, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: andreott@cnpqg.embrapa.br

² Farmacêutica-Bioquímica, Ph.D., CRF-MS Nº 411/80, Departamento de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Correio eletrônico: matosmf@nin.ufms.br

³ Médica-Veterinária, CRMV-MS Nº 1.452, Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal – Iagro/MS.

⁴ Médica-Veterinária, Ph.D., CRMV-PR Nº 2.241, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Correio eletrônico: roslocdi@ufpr.br

O aborto associado à neosporose bovina segue dois modelos: o endêmico e o epidêmico. O endêmico ocorre na maioria dos rebanhos com vacas infectadas via congênita, e é caracterizado por uma elevada taxa de aborto (> 5% ao ano), que persiste durante anos, sendo duas a três vezes maior nas vacas soropositivas do que nas soronegativas. Já o epidêmico, provavelmente por contaminação após o nascimento sugerindo transmissão do tipo horizontal (McAllister & Latham, 2002).

Diagnóstico da neosporose

O diagnóstico depende de uma combinação entre o histórico do rebanho, sinais clínicos e dados de laboratório. O quadro clínico sugestivo de neosporose é a presença de sinais neurológicos e de polimiosite em bovinos jovens. Em bovinos adultos, a ocorrência de abortos e de natimortos são sinais sugestivos de infecção por *N. caninum* (McAllister, 1999).

Os casos assintomáticos em bovinos e os sinais inespecíficos da neosporose dificultam o diagnóstico clínico da doença. Conseqüentemente, o diagnóstico laboratorial é imprescindível para confirmar uma infecção por *N. caninum*.

A confirmação laboratorial é realizada pelo diagnóstico parasitológico, com os exames histopatológico e imuno-histoquímico, a reação em cadeia da polimerase – PCR – (Pitel et al., 2001) e o isolamento dos parasitas (Yamane et al., 1997) mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório.

O diagnóstico de aborto associado a *N. caninum* é feito geralmente pelos exames histopatológico e imuno-histoquímico dos tecidos fetais. A utilização de diferentes técnicas de diagnóstico, como a PCR, aumenta a chance de detectar a infecção por *N. caninum* nos fetos (Sager et al., 2001). Nos casos de aborto também devem ser investigadas outras doenças, como rinotraqueíte infecciosa bovina – IBR –, diarreia viral bovina – BVD –, campilobacteriose, leptospirose, brucelose, clamidiose e tricomonose (Andreotti et al., 2003).

A sorologia é utilizada como método de diagnóstico nos estudos epidemiológicos de abortos e o seu custo deve ser observado em função das limitações que podem acarretar.

Métodos de diagnóstico sorológico

Existem vários testes que detectam anticorpos séricos específicos para *N. caninum*, principalmente em cães e bovinos (Tabela 1) (Atkinson et al., 2000). Os mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta – IFI

– e o teste imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA) (Pereira-Bueno et al., 2003).

Tabela 1. Exames sorológicos utilizados no diagnóstico de *Neospora caninum* (Atkinson et al., 2000).

Métodos	Antígenos
IFI	Taquizoítas
<i>Immunoblot</i>	Extrato solúvel
ELISA cinético	Sonicado
ELISA	Extrato solúvel
ELISA	Extrato "iscom"
CI-ELISA	P65
r-ELISA	NCDGI-21, N54
IFAT-ELISA	Taquizoítas
MAT	Taquizoítas

IFI = reação de imunofluorescência indireta

Immunoblot = identidade antigênica

ELISA = ensaio imunoenzimático

CI-ELISA = ELISA de competição e inibição

r-ELISA = ELISA recombinante

"Iscom" = complexo imunoestimulante

IFAT = *indirect fluorescent antibody test*

MAT = teste de aglutinação modificada

Os testes sorológicos de IFI e de ELISA necessitam do conjugado (anticorpo secundário espécie-específico) para detectar os anticorpos de *N. caninum*.

Os antígenos de *N. caninum* podem ser naturais ou recombinantes, e diferem de acordo com o teste sorológico. No método da IFI, os taquizoítas inteiros são fixados nas lâminas, e nos diferentes tipos de ELISA, utilizam o extrato de taquizoítas (taquizoítas inteiros; antígenos de taquizoítas incorporados a um complexo imunoestimulante e antígenos recombinantes).

Os taquizoítas são obtidos de cultivo *in vitro* de cepas de *N. caninum* isoladas de bovinos e de cães, e não existem indicações que possíveis pequenas diferenças antigênicas entre os isolados afetem a eficácia dos testes (Yamane et al., 1997).

Reação de imunofluorescência indireta para *Neospora caninum*

A reação de imunofluorescência indireta para *N. caninum* ocorre pela detecção de anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular dos taquizoítas. Os anticorpos do soropositivo em teste ligam-se aos antígenos

de superfície dos taquizoítas fixados na lâmina. Em seguida é usado o anticorpo sensibilizado contra o anticorpo da espécie animal em teste conjugado ao isotiocianato de fluoresceína que se liga ao anticorpo positivo em teste (Fig.

1a). A presença dessa reação é detectada pela observação da fluorescência de cor esverdeada na superfície dos taquizoítas, em um microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta (Fig. 1b).

Imunofluorescência indireta

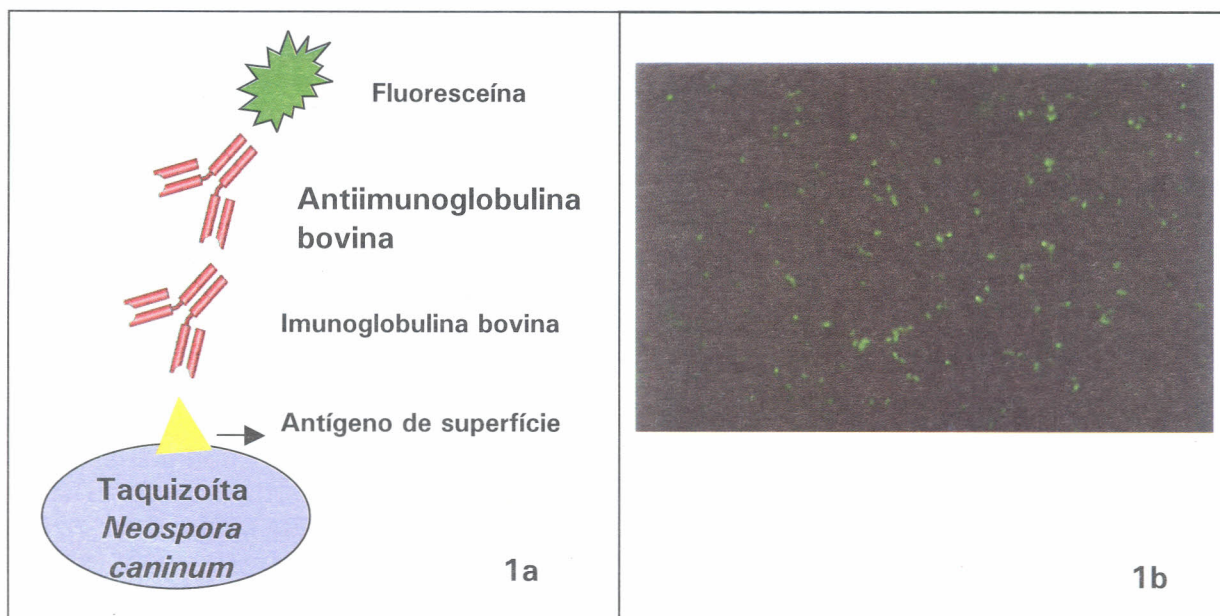


Fig. 1. Reação de imunofluorescência indireta. 1a - Esquema representativo da reação de imunofluorescência indireta. 1b - Fotografia de um ensaio com um soropositivo para *Neospora caninum* em microscópio de campo escuro. Aumento de 100 X.

A reação de imunofluorescência indireta é a metodologia de referência para pesquisa de anticorpos de *N. caninum*, considerada como padrão ouro, um teste padrão para calibração e comparação com os novos testes. A presença dos anticorpos IgM é indicativa de infecção aguda, porém, a cinética de produção de IgM na neosporose ainda é pouco conhecida em bovinos. A determinação dos anticorpos da classe IgG é utilizada para o diagnóstico de neosporose em bovinos. Um aumento progressivo do título de anticorpos da classe IgG, em um período, geralmente é indicativo de infecção aguda (Moore et al., 2002).

O resultado positivo no método da IFI é indicado pela fluorescência de todo o taquizoíta, nos soros com títulos moderados a elevados. Fluorescência reduzida ou apical ocorre nos soros com títulos baixos, e nas reações cruzadas não específicas causadas por infecção com espécies relacionadas, como *Toxoplasma gondii*. Também pode ser por causa do mecanismo de escape imunológico usado pelo parasita (Pires, 1987), devendo-se interpretar os resultados com cautela. Os anticorpos não específicos que produzem fluorescência reduzida e, conseqüentemente, uma reação cruzada são desconhecidos. A reação cruzada entre os

anticorpos de *N. caninum* e *T. gondii* não foi observada em soros de bovinos (Dubey & Lindsay, 1996).

O teste de imunofluorescência indireta é uma alternativa economicamente viável para o diagnóstico sorológico da neosporose levando um tempo aproximado de uma hora e trinta minutos para a execução do ensaio.

A Embrapa Gado de Corte, com o apoio da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – Fundect/MS – e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS –, criou condições laboratoriais e metodológicas a partir de um projeto de pesquisa para a produção e padronização de taquizoítas de *N. caninum*, mantidos em cultivo em células Vero e estocados em nitrogênio líquido, para a sua utilização como antígeno em IFI, e a realização dos ensaios para o diagnóstico sorológico. Essa tecnologia, já disponibilizada, permite o diagnóstico sorológico da neosporose com um menor custo e maior rapidez para atender o Brasil Central e a possibilidade de fornecimento de antígenos para outras regiões do país.

Referências bibliográficas

- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, n. 3, p. 417-431, 2000.
- ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; PAIVA, F. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003. 51 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 136).
- ATKINSON, R.; HARPER, P. A. W.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. **Parasitology Today**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 110-113, 2000.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, n. 11, p. 1803-1806, 2001.
- BOGER, L.; HATTEL, A. L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-6, 2003.
- CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. F. E.; GONDIM, L. F. P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.
- DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 161-169, 2003.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 1-59, 1996.
- 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**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 929-946, 2002.
- 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**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F. J.; MEERSCHMAN, F. de; ELLIS, J. T.; INNES, E. A.; McALLISTER, M. M.; ORTEGA-MORA, L. M.; TENTER, A. J.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; WILLIAMS, D. J. L.; WOUDA, W. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 877-924, 2000.
- LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R. T. B.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in Southern Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 6, p. 1493-1494, 2001.
- McALLISTER, D.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 4-5, 2002.
- McALLISTER, M. M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. **Parasitology Today**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 216-217, 1999.
- MOORE, D. P.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C.; POSSO, M. A.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; SPÄTH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 303-316, 2002.
- PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 143-152, 2003.

PIRES, P. P. Aspectos imunoparasitológicos da infecção experimental por *Sarcocystis cruzi* (HASSELMANN, 1926) (APICOMPLEXA:SARCOSCYSTIDAE) em bovinos. 1987. 108 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1987.

PITEL, P. H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLE, J. J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n. 4, p. 269-277, 2001.

REICHEL, M. P. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 78, n. 4, p. 258-261, 2000.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 1-15, 2001.

SAWADA, M.; KONDO, H.; TOMIOKA, Y.; PARK, C.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 247-252, 2000.

VENTURINI, M. C.; VENTURINI, D.; BACIGALUPE, D.; MACHUCA, M.; ECHAIDE, I.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; DI LORENZO, C.; GUGLIELMONE, A.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1705-1708, 1999.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P. A. *In vitro* isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. **Research in Veterinary Science**, London, v. 63, n. 1, p. 77-80, 1997.

Comunicado Técnico, 86

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
 Endereço: Rodovia BR 262, km 4, Caixa Postal 154
 79002-970 Campo Grande, MS
 Fone: (67) 368 2083
 Fax: (67) 368 2180
 E-mail: publicacoes@cnpgc.embrapa.br



1ª edição
 1ª impressão (2004): 500 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Ivo Martins Cezar
Secretário-Executivo: Mariana de Aragão Pereira
Membros: Antonio do Nascimento Rosa, Arnildo Pott, Cacilda Borges do Valle, Ecila Carolina N. Z. Lima, Lúcia Gatto, Maria Antonia M. de U. Cintra, Mariana de Aragão Pereira, Rodney de Arruda Mauro, Ténisson Waldow de Souza

Expediente

Supervisor editorial: Ecila Carolina N. Z. Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Canto
Editoração eletrônica: Ecila Carolina N. Z. Lima