

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Desenvolvimento de um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose
bovina**

Francine Alves Sinnott

Pelotas, 2014

Francine Alves Sinnott

**Desenvolvimento de um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose
bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Parasitologia).

Orientador: Cláudia Pinho Hartleben

Coorientador: Leonardo Garcia Monte

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S615d

Sinnott, Francine Alves

Desenvolvimento de um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose bovina / Francine Alves Sinnott. – 60f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Cláudia Pinho Hartleben ; Coorientador Leonardo Garcia Monte.

1.Parasitologia. 2.Neosporose. 3.Neospora caninum. 4.ELISA. 5.Diagnóstico. 6.Nc-p43. I.Hartleben, Cláudia Pinho. II.Monte, Leonardo Garcia. III.Título.

CDD: 593.1

Francine Alves Sinnott

Desenvolvimento de um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose bovina

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2014

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben (Orientador)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Sibeles Borsuk
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Leonardo Garcia Monte
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho a minha filha Luiza, meu
bem mais precioso, e ao meu melhor amigo,
companheiro, confidente e esposo Felipe, por
toda compreensão e amor.**

Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela oportunidade de realização deste mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me proporcionar uma bolsa de estudos.

Ao Centro de Biotecnologia e ao Instituto de Biologia, que me deram suporte técnico para poder realizar este trabalho.

A minha orientadora Prof^a. Cláudia Hartleben, pela confiança, amizade, compreensão e orientação, pessoa insubstituível em minha formação profissional e de grande agregação em minha vida pessoal.

Ao meu coorientador Leonardo Monte por toda ajuda, amizade, descontração e orientação.

A professora Sibeles Borsuk que construiu e me concedeu o plasmídeo contendo o gene de interesse para este trabalho.

Ao meu esposo Felipe, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando em minhas decisões, entendendo meus momentos de ausência, seu amor e amizade fazem toda a diferença.

A minha filha Luiza, que sempre teve toda compreensão do mundo e mesmo com sua pouca idade, no auge dos seus 5 anos, sempre teve as palavras mais reconfortantes, mais amáveis, por você todo o esforço vale a pena.

Ao meu pai Carlos, que sempre me ajudou, sendo meu maior incentivador e motivador, sem você nada disso seria possível.

A minha mãe Denise, que mesmo a quilômetros de distância, sempre esteve perto em pensamento, sinto muito a sua falta.

Aos meus irmãos, Tiago, Lucas, Octávio e Alexsandra, os mais parceiros, os mais festeiros, os mais incríveis, vocês me completam.

A minha sogra Anjara, que sempre foi uma mãe para mim, a melhor avó do mundo, jamais poderei agradecer por tudo que você faz pela nossa princesa.

A minha madrastra Cleusa, que sempre foi uma “ótima madrastra”, uma avó de coração muito dedicada, obrigada por toda ajuda.

As minhas amigas lindas e companheiras, Berta, Isabel, Natália, Taís e Vanessa, vocês foram fundamentais para que eu pudesse desopilar e retornar todas as segundas-feiras cheia de gás.

Aos colegas do laboratório 10, valeu por toda parceria, ajuda, descontração, vocês fazem dos dias de trabalho algo extremamente agradável.

Aos “meus” estagiários, Roberta e Bruno, muito obrigada por toda a ajuda, nós formamos um trieto fantástico.

A Deus, por me guiar e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

Resumo

SINNOTT, Francine Alves. **Desenvolvimento de um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose bovina**. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Neosporose é a doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Neospora caninum*, causando problemas reprodutivos, como abortos e mortalidade neonatal em diversos animais, sendo considerada uma das principais causas de abortos em bovinos em todo o mundo. O diagnóstico sorológico padrão é a imunofluorescência indireta (IFI), porém devido a semelhanças morfológicas e antigênicas de *N. caninum* com outros protozoários do filo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp., pode ocorrer resultados falsos positivos. Para melhorar o diagnóstico desta parasitose e diminuir as reações cruzadas com outros coccídeos, à utilização de proteínas recombinantes específicas de *N. caninum* vem sendo descrita. A proteína de superfície Nc-p43 codificada pelo gene *NcSRS2* é específica do parasito e está presente em taquizoítos e bradizoítos de *N. caninum*. Ensaio no formato ELISA indireto vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico da neosporose, no entanto os ELISAs de bloqueio podem apresentar nível adicional de especificidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA no formato bloqueio (b-ELISA) para o diagnóstico da neosporose bovina. Para tal, o gene *NcSRS2*, previamente clonado em vetor plasmidial, foi utilizado para produzir a proteína recombinante (rNc-p43) em sistema de expressão procarioto *Escherichia coli*. A proteína purificada foi utilizada para produzir um anticorpo policlonal (pAb/rNc-p43) em coelho e este foi posteriormente purificado e caracterizado através de ELISA indireto. Para o desenvolvimento do b-ELISA foram utilizados um total de 152 soros bovinos (71 negativos e 81 positivos) e 10 soros bovinos positivos para toxoplasmose, todos previamente confirmados por IFI. Como controles, um *pool* de todos os soros positivos e um *pool* de todos os soros negativos foi utilizado, além de um soro normal de terneiro, confirmado através de IFI, utilizado como controle negativo referencial. O percentual de inibição de cada amostra foi determinado pela comparação da média da densidade óptica (DO) de cada soro teste com a média da DO do controle negativo referencial. O ponto de corte foi determinado pelo percentual de inibição do *pool* negativo. Os resultados obtidos sugerem que o b-ELISA é uma ferramenta que pode ser utilizada no diagnóstico da neosporose bovina, com sensibilidade de 98.7% e especificidade de 88.7%, quando comparado com a IFI. Os anticorpos contra *T. gondii* presentes nas amostras positivas para toxoplasmose não foram capazes de reconhecer a rNc-p43. O b-ELISA demonstrou que as amostras de soros positivas para *N. caninum* são capazes de impedir a ligação do pAb/rNc-p43, possibilitando a detecção de diferentes classes de anticorpos em um único ensaio. Esta técnica pode ser uma alternativa de triagem para a detecção de anticorpos contra *N. caninum* em populações de bovinos.

Palavras-chave: Neosporose; *Neospora caninum*; ELISA; diagnóstico; Nc-p43

Abstract

SINNOTT, Francine Alves. **Development of a blocking ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis**. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Neosporosis is a disease caused by the obligate intracellular parasite *Neospora caninum*, causing reproductive disorders, such as abortions and stillbirths in several animals, being considered a major cause of abortion in cattle worldwide. The serological standard diagnosis is indirect fluorescent-antibody test (IFAT), but due to morphological and antigenic similarities of *N. caninum* with other protozoa of the phylum Apicomplexa, such as *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp., false positive results may occur. To improve the diagnosis of this disease and reduce cross-reactions with other coccidian, the use of specific recombinant proteins of *N. caninum* has been described. The Nc-p43 surface protein encoded by the gene *NcSRS2* is specific of the parasite and is present in tachyzoites and bradyzoites of *N. caninum*. Indirect ELISA format assays have been developed for the diagnosis of neosporosis, however the blocking ELISA may present additional level of specificity. In this context, the objective of this study was develop and standardize a blocking ELISA (b-ELISA) for the diagnosis of bovine neosporosis. To this end, *NcSRS2* gene, previously cloned into plasmid vector, was used to produce the recombinant protein (rNc-p43) in prokaryotic expression system *Escherichia coli*. The purified protein was used to produce a polyclonal antibody (pAb/rNc-p43) in rabbit and this was further purified and characterized by indirect ELISA. For the development of the b-ELISA were used a total of 152 cattle sera (71 negative and 81 positive) and 10 positive cattle sera for toxoplasmosis, all previously confirmed by IFI. As controls, a pool of all positive sera and a pool of all negative sera were used, in addition to a normal calf serum, confirmed by IFAT, used with negative reference sera. The percent inhibition for each sample was determined by comparing the optical density (OD) mean of test sera to the OD mean of negative reference sera. The cut-off value was determined as the percent inhibition of negative pool. The results suggest that the b-ELISA is a tool that can be used for diagnosis of bovine neosporosis, with a sensitivity of 98.7% and specificity of 88.7% when compared with the IFAT. Antibodies against *T. gondii* present in positive samples for toxoplasmosis were not able to recognize the rNc-p43. The b-ELISA showed that serum samples positive for *N. caninum* is able to prevent the binding of pAb/rNc-p43, enabling detect different class of antibodies in a single assay. This technique is an alternative to screening for antibodies against *N. caninum* in cattle populations.

Key words: Neosporosis; *Neospora caninum*; ELISA; diagnostic; Nc-p43

Sumário

1 Introdução geral	09
2 Objetivos	12
3 Artigo 1.....	13
Métodos de diagnóstico da neosporose – os últimos cinco anos.....	14
Resumo	14
Abstract.....	15
Introdução.....	15
Delineamento do estudo.....	18
Antígenos de <i>Neospora caninum</i>	18
Diagnóstico para neosporose	20
Histopatologia	20
Imunohistoquímica (IHC)	20
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	21
Ensaio sorológicos	23
Imunofluorescência indireta (IFI)	24
Kits comerciais	27
Desenvolvimento de novos métodos sorológicos	28
Conclusão	31
Referências	32
4 Artigo 2.....	40
Development of a blocking ELISA using the recombinant protein NcSRS2 for the diagnosis of bovine neosporosis	41
Abstract.....	42
Short communication.....	43
Acknowledgements.....	48
References	48
5 Conclusões gerais.....	55
Referências	56

1 INTRODUÇÃO GERAL

Neospora caninum é um parasito do filo Apicomplexa, que foi isolado primeiramente por Dubey et al. (1988) causando a doença conhecida por neosporose, sendo esta uma das principais causas de abortos em bovinos no mundo, tanto em criações de gado de leite quanto em gado de corte (ANDREOTTI et al., 2009; COBADIOVA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014). *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, sendo os canídeos os hospedeiros definitivos, e os hospedeiros intermediários podendo ser uma ampla variedade de mamíferos, como bovinos, equinos, caprinos, ovinos, entre outros (DONG, et al., 2012). A neosporose canina se caracteriza por paralisia muscular enquanto a neosporose bovina apresenta abortos e mortalidade neonatal (HIASA, et al., 2012)

Os canídeos infectados eliminam em suas fezes os oocistos não esporulados, que se tornam infectantes no ambiente, contendo 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada, sendo ingeridos juntamente com a pastagem e água pelos hospedeiros intermediários (DUBEY; LINDSAY, 1993; MACHADO et al., 2011). Os esporozoítos são liberados e invadem as células do trato intestinal, transformando-se em taquizoítos, representando a forma aguda da doença (WESTON et al., 2012; GOODSWEN et al., 2013). Os taquizoítos se reproduzem de forma rápida e podem ser encontrados em células do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, hepatócitos, entre outras (DUBEY et al., 1988; GALGUT et al., 2010). A principal localização do parasito é no cérebro, tendo menor ocorrência nos outros órgãos (JIMENEZ-RUIZ et al., 2012).

No interior das células, os taquizoítos podem se transformar em bradizoítos, com multiplicação mais lenta, conferindo a fase crônica da doença nos hospedeiros intermediários (GONDIM et al., 1999; MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2011). Os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerirem os tecidos de hospedeiros intermediários contendo cistos com bradizoítos, os quais, no epitélio intestinal, se diferenciam em formas sexuadas, multiplicando-se e gerando oocistos que são liberados nas fezes (DUBEY, 1999; ASMARE, et al., 2013).

Os hospedeiros definitivos também podem se auto-infectar, quando consomem suas próprias fezes contaminadas ou quando consomem fezes de outros animais infectados, se tornando hospedeiro intermediário e desenvolvendo cistos teciduais (JARDINE, 1996).

Em bovinos a transmissão vertical é responsável por até 95% das infecções, não obstante, este tipo de transmissão não confere infecção em 100% dos casos, sendo necessária a transmissão horizontal para que o parasito se mantenha no rebanho (CABRAL et al., 2009; SANTOLARIA et al., 2011).

As metodologias de histopatologia, imunohistoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento do protozoário, são utilizadas no diagnóstico da doença após a morte do animal, sendo a imunohistoquímica o padrão ouro para o diagnóstico do *N. caninum* (BYREM et al., 2012). Para o diagnóstico em populações animais, a imunofluorescência indireta (IFI), a qual utiliza taquizoítos intactos fixados, vêm sendo utilizada como teste sorológico referencial (FROSSLING et al., 2003; CARDOSO et al., 2012; ANDRADE et al., 2013). Porém, devido à utilização de antígeno total (taquizoítos inteiros) na IFI podem ocorrer reações cruzadas com o protozoário *Toxoplasma gondii*, pois este apresenta grande similaridade morfológica e compartilha muitos antígenos com o *N. caninum*. Ainda, a IFI é um teste laborioso, pois necessita da manutenção de cultivos de taquizoítos *in vitro* (DONG et al., 2013).

A utilização de antígenos recombinantes de superfície celular, exclusivos da espécie *N. caninum*, é uma alternativa para aumentar a acurácia dos testes sorológicos, evitando assim resultados falsos – positivos (JIMENEZ-RUIZ et al., 2013). Os antígenos de superfície, em suas formas recombinantes, vêm sendo utilizados em ensaios imunoenzimáticos (ELISAs e *immunoblotting*), aglutinação em látex, os quais foram descritos visando o aumento da sensibilidade e especificidade dos testes (HU et al., 2011; MORAVEJI et al., 2012; DE SA et al., 2013; DONG et al., 2013; HE et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; GHALMI et al., 2014).

Dentre estes antígenos, a proteína de superfície Nc-p43 recombinante (rNc-p43) codificada pelo gene *NcSRS2* (sequência relatada de superfície), tem sido utilizada em ensaios diagnósticos na busca de um teste específico para *N. caninum*. Este antígeno é expresso em taquizoítos e bradizoítos e possui função importante no reconhecimento, adesão e invasão da célula hospedeira. A imunogenicidade da NcSRS2 já foi demonstrada em estudos anteriores (HOSSEININEJAD et al., 2010; BORSUK et al., 2011;).

Os ELISAs possuem ampla aplicação no diagnóstico de doenças infecciosas, devido à alta sensibilidade, possibilidade de automação e rapidez no processamento de amostras em larga escala (GOFF et al., 2003; HARTLEBEN et al., 2012). O formato ELISA indireto tem sido amplamente utilizado para a detecção de anticorpos no soro dos animais (PINHEIRO et al., 2013; TAKASHIMA et al., 2013). Contudo, apesar da sensibilidade e especificidade deste teste, estes utilizam anticorpos espécie específicos, além da possibilidade de reações inespecíficas entre imunoglobulinas (DE SA et al., 2013). Neste contexto, o ELISA de bloqueio para a detecção de anticorpos contra a proteína NcSRS2, pode fornecer um nível adicional de especificidade, pois o anticorpo é dirigido para um epítopo único específico para o organismo a ser detectado.

A hipótese deste trabalho é de que o desenvolvimento de um ensaio diagnóstico no formato ELISA de bloqueio utilizando o antígeno recombinante NcSRS2 e anticorpo policlonal contra este antígeno, pode apresentar melhor acurácia quando comparado ao teste referencial.

A dissertação está apresentada na forma de artigos científicos, o que a nosso ver propicia uma divulgação objetiva e rápida dos resultados obtidos. O artigo 1 é uma revisão bibliográfica sobre o diagnóstico da neosporose bovina, se baseando em trabalhos publicados em periódicos disponíveis no site de busca PubMed, nos últimos cinco anos. Esse trabalho será submetido para publicação no periódico *Arquivos do Instituto Biológico*. O artigo 2 descreve a padronização e o desenvolvimento de um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose bovina, utilizando a proteína NcSRS2 em sua forma recombinante (rNcSRS2) e um anticorpo policlonal de coelho produzido contra a rNcSRS2. Esse trabalho será submetido para publicação no periódico *Current Microbiology*. Os artigos estão formatados conforme exigência dos periódicos científicos em que serão publicados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um ELISA de bloqueio para o diagnóstico da neosporose bovina.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir a proteína rNc-p43 em sistema procarioto;
- Produzir anticorpo policlonal (pAb) anti- rNc-p43 em coelho;
- Desenvolver e padronizar um ELISA de bloqueio com soros bovinos, utilizando a proteína rNc-p43 e o pAb anti- rNc-p43;
- Comparar o desempenho do ELISA de bloqueio desenvolvido com o teste sorológico padrão.

3 ARTIGO 1

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE – OS ÚLTIMOS CINCO ANOS

*Artigo a ser submetido ao periódico *Arquivos do Instituto Biológico*.*

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA NEOSPOROSE – OS ÚLTIMOS CINCO ANOS

Francine Alves Sinnott¹, Leonardo Garcia Monte¹, Gizele Lima de Sá¹, Diene de Borba Pacheco¹, Cláudia Pinho Hartleben^{1,*}

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico, Campus Capão do Leão, s/n °, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. * Corresponding author: hartlebenclaudia@gmail.com

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário do filo Apicomplexa, parasito intracelular obrigatório que acomete, principalmente, os bovinos e cães, causando na bovinocultura sérios problemas econômicos, sendo considerada uma das principais causas de abortos em todo o mundo. Por não existir tratamentos e vacinas eficazes, o diagnóstico é a melhor estratégia de controle. A utilização de proteínas específicas do protozoário, nas suas formas recombinantes, é uma ferramenta que está sendo cada vez mais utilizada, tanto para a produção de anticorpos monoclonais e policlonais na detecção do parasito, quanto para o desenvolvimento ensaios indiretos, que visam à detecção de anticorpos específicos contra o patógeno. Entre os métodos indiretos, destaca-se a utilização de uma variedade de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). A reação em cadeia da polimerase (PCR) também vem sendo utilizada com o objetivo de amplificar os genes exclusivos do parasito a partir de diferentes tecidos. Muitos estudos ainda devem ser realizados para melhorar a acurácia do diagnóstico da doença, porém avanços já foram obtidos e os métodos citados acima mostraram-se promissores.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, diagnóstico, neosporose.

ABSTRACT

NEOSPOROSIS – THE LAST FIVE YEARS OF DIAGNOSTIC METHODS.

Neospora caninum is a protozoan of the phylum Apicomplexa, obligate intracellular parasite that mainly affects bovine and dogs, and considered to be a major cause of abortions worldwide which causes serious economic losses in cattle industry. Because no treatments and effective vaccines are available, the diagnosis is the best control strategy. The using of parasite specific proteins in their recombinant form, is a tool that is being widely used for the production of both monoclonal and polyclonal antibodies as sources for detection of the parasite, as in indirect tests aimed at detecting of specific antibodies against the pathogen. Among the indirect methods, there is the use of a variety of enzyme immunoassays (ELISA). The polymerase chain reaction (PCR) has also widely used in order to amplify the unique genes of the parasite from different tissues. Many studies are still necessary to improve the accuracy of disease diagnosis, but advances have been achieved and the above methods proved promising

Key words: *Neospora caninum*, diagnostic methods, neosporosis.

1 Introdução

Neospora caninum é um protozoário heteroxeno intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, considerado um dos principais causadores de abortos em bovinos em todo o mundo (BACIGALUPE *et al.*, 2013; COBADIOVA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014). Este protozoário até 1984, foi erroneamente identificado como *Toxoplasma gondii*, devido a semelhanças morfológicas e antigênicas (BJERKAS *et al.*, 1984), porém, a descrição de um novo gênero e nova espécie ocorreu somente quatro anos mais tarde (DUBEY *et al.*, 1988).

No Brasil, estudos recentes descreveram uma soroprevalência para a neosporose entre 2,5 a 14,9% em fazendas de gado de corte e 14,1 a 34,8% em criações de gado de leite, com prejuízos econômicos ultrapassando 100 milhões de dólares por ano nestes setores (REICHEL *et al.*, 2013).

Canídeos como o cão doméstico, coiotes e lobos, são considerados hospedeiros definitivos do protozoário (UZEDA *et al.*, 2013). Em cães, a neosporose causa danos significativos, como problemas neuromusculares que podem levar ao óbito (GALGUT *et al.*, 2010). Os bovinos são classificados como os principais hospedeiros intermediários, sendo o aborto e a mortalidade neonatal os principais sinais clínicos. Porém, outros ruminantes, equinos e aves podem desenvolver a doença e assumir o caráter de hospedeiros intermediários, embora nestes, os sinais clínicos sejam mais raros (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; DUBEY *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2011). Mesmo o homem interagindo diretamente com hospedeiros infectados, a doença não é considerada uma zoonose (DUBEY; SCHARES, 2011).

Os taquizoítos do *N. caninum* são considerados as formas infectantes da fase aguda da doença nos hospedeiros intermediários, multiplicando-se ativamente em diferentes tipos de células, sendo disseminados pela corrente sanguínea e sistema linfático, induzindo uma resposta imune (GOODSWEN *et al.*, 2013; WESTON *et al.*, 2012b). Os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, evadindo assim as defesas do hospedeiro, apresentando multiplicação lenta em cistos teciduais, principalmente no sistema nervoso central de bovinos e cães, caracterizando a fase crônica da doença (GALGUT *et al.*, 2010; JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2012; MARUGAN-HERNANDEZ *et al.*, 2011).

Os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerirem os tecidos de hospedeiros intermediários contendo cistos com bradizoítos, os quais, no epitélio intestinal, se diferenciam em formas sexuadas, multiplicando-se e gerando oocistos que são liberados nas fezes

(DUBEY, 2005). Os oocistos esporulados são as formas infectantes para os hospedeiros intermediários, caracterizando a transmissão horizontal (MACHADO *et al.*, 2011). Porém, a principal via de transmissão para os hospedeiros intermediários é a transplacentária ou vertical (BACIGALUPE *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2012), a qual é responsável por cerca de 50 a 95% das infecções, representando um importante papel na manutenção da patologia nos rebanhos (CABRAL *et al.*, 2009; SANTOLARIA *et al.*, 2011). Esta via de transmissão ocorre devido à imunossupressão no período gestacional das fêmeas infectadas, diferenciação de bradizoítos e passagem de taquizoítos através da placenta (HOWE *et al.*, 2012).

O diagnóstico da neosporose é realizado rotineiramente por exames histopatológicos e imunohistoquímicos utilizando tecidos de fetos abortados. Ainda, a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes específicos do parasito em amostras de tecido cerebral ou outros tecidos de animais abortados também pode ser utilizada (WILKOWSKY *et al.*, 2011). A detecção de anticorpos antígeno – específicos presentes nas amostras de soros suspeitas também são ferramentas atualmente disponíveis (JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2012). Entre os ensaios sorológicos, a imunofluorescência indireta (IFI) é considerada o padrão ouro (DUBEY *et al.*, 1988). Entretanto, para a realização da IFI, necessita-se de taquizoítos intactos como antígeno e, por este motivo, o teste apresenta reações cruzadas com outros integrantes do filo Apicomplexa, como o protozoário *T. gondii* (DONG *et al.*, 2012). Para melhorar a acurácia dos métodos de diagnóstico, vários testes vem sendo desenvolvidos, os quais utilizam proteínas específicas do protozoário, nas suas formas nativa e recombinante, diminuindo assim as reações cruzadas com outros coccídeos (ANDREOTTI *et al.*, 2009; BORSUK *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2013; HOSSEININEJAD *et al.*, 2010; MORAVEJI *et al.*, 2012; YBANEZ *et al.*, 2013).

Uma vez que nenhum tratamento ou vacina eficaz estejam disponíveis para controlar a neosporose, há necessidade urgente de melhorar as estratégias de controle desta doença (DE

SA *et al.*, 2013) e a utilização de métodos de diagnósticos sensíveis e específicos são alternativas para identificar e controlar a disseminação do protozoário (ALTBUCH *et al.*, 2012). Por tal motivo, o objetivo deste trabalho foi revisar os estudos realizados nos últimos cinco anos, que possuem por finalidade o desenvolvimento de métodos de detecção do antígeno e de anticorpos para a o diagnóstico da neosporose.

2 Delineamento do estudo

A pesquisa de artigos para esta revisão foi feita através do site de busca PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), limitando a pesquisa ao período dos últimos cinco anos, utilizando como palavras-chave os termos “Neosporosis”, “Immunodiagnosis *Neospora caninum*”, “Detection *Neospora caninum*” e “Diagnosis *Neospora caninum*” obtendo um total de 131, 24, 92 e 181 artigos, respectivamente, até a data de 01 de fevereiro de 2014. Destes artigos, todos os resumos foram analisados, e todos os trabalhos que apresentavam como objetivo o desenvolvimento de métodos de diagnóstico da neosporose, foram incluídos para compor esta revisão. Todos os trabalhos encontrados nesta busca que não seriam relevantes para este estudo foram excluídos.

3 Antígenos de *Neospora caninum*

Uma variedade de antígenos de *N. caninum* vem sendo descrita, muitos dos quais são possíveis alvos vacinais (JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2012; UCHIDA *et al.*, 2013; WESTON *et al.*, 2012a) e de diagnóstico (GHALMI *et al.*, 2014; HE, *et al.*, 2013; HIASA *et al.*, 2012b; HU, *et al.*, 2011; YBANEZ *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2012). Entre os antígenos utilizados para o diagnóstico da neosporose, é possível destacar as proteínas de superfície NcSRS2, NcSAG1, NcSAG4, Ncp40, a proteína de citoesqueleto NcPF, proteínas de grânulo denso NcGRA2, NcGRA6, NcGRA7, a serinoprotease NcSUB1 e a proteína de micronema

NcMIC10. Todos os antígenos descritos acima foram os mais frequentes, nos últimos cinco anos, em estudos de desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico (Tabela 1). Os antígenos de membrana são importantes para a sobrevivência do parasito, pois estão envolvidos com o reconhecimento e com a adesão e invasão das células hospedeiras, além de estimular à resposta imune (ANDREOTTI *et al.*, 2009; BORSUK *et al.*, 2011; DE SA *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013; HIASA *et al.*, 2012a; HOSSEININEJAD *et al.*, 2010; MORAVEJI *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013; TAKASHIMA *et al.*, 2013; UZEDA *et al.*, 2013; WILKOWSKY *et al.*, 2011). Dentre as proteínas de superfície celular destacam-se NcSAG1 e NcSRS2, sendo a proteína NcSRS2 a mais indicada para detecção de anticorpos nas fases crônica e aguda da doença devido a sua presença nas formas de bradizoítos e taquizoítos.

Tabela 1

Antígenos mais utilizados para o desenvolvimento de diagnósticos para neosporose.

Antígeno	Localização no <i>N. caninum</i>	Taquizoíto – T Bradizoíto – B	Referência
NcSRS2	Superfície celular	T e B	DE SA <i>et al.</i> (2013), PINHEIRO <i>et al.</i> (2013), UZEDA <i>et al.</i> (2013), DONG <i>et al.</i> (2012), BORSUK <i>et al.</i> (2011), HOSSEININEJAD <i>et al.</i> (2010), ANDREOTTI <i>et al.</i> (2009)
NcSAG1	Superfície celular e grânulo denso	T	TAKASHIMA <i>et al.</i> (2013), DONG <i>et al.</i> (2013), DONG <i>et al.</i> (2012), HIASA <i>et al.</i> (2012)a, MORAVEJI <i>et al.</i> (2012), WILKOWSKY <i>et al.</i> (2011)
NcSAG4	Superfície celular	B	HU <i>et al.</i> (2011)
Ncp40	Superfície celular	*	HE <i>et al.</i> (2013)
NcPF	Citoesqueleto	*	HIASA <i>et al.</i> (2012)b
NcGRA2	Grânulo denso	T e B	DONG <i>et al.</i> (2012)
NcGRA6	Grânulo denso	*	GHALMI <i>et al.</i> (2014)
NcGRA7	Grânulo denso	T e B	TAKASHIMA <i>et al.</i> (2013), UZEDA <i>et al.</i> (2013), HIASA <i>et al.</i> (2012)a;

			HIASA <i>et al.</i> (2012)b
NcSUB1	Serino protease	T	YBANEZ <i>et al.</i> (2013)
NcMIC10	Micronema	T	YIN <i>et al.</i> (2012)

* Localização não descrita.

4 Diagnóstico da neosporose

4.1 Histopatologia

Exames histológicos podem confirmar a neosporose em fetos abortados pela visualização das lesões características causadas pelo protozoário, como encefalite não supurativa, miocardite, hepatites, placentites, etc. Os órgãos geralmente utilizados neste diagnóstico são cérebro, placenta, fígado e coração (DUBEY; SCHARES, 2006). Porém, esta técnica necessita sempre da confirmação da presença do parasito já que outros protozoários poderiam causar lesões similares (CABRAL *et al.*, 2009; DUBEY; SCHARES, 2011).

4.2 Imunohistoquímica (IHC)

A IHC é considerada o teste padrão ouro para a detecção do parasito em fetos abortados, pois geralmente a quantidade de *N. caninum* nos tecidos é pequena (KHODAKARAM-TAFTI *et al.*, 2012), dificultando a visualização pela técnica de coloração hematoxilina e eosina (HE) utilizada nos exames histológicos. Contudo, a eficiência da IHC é prejudicada por amostras de tecidos de abortos autolisados (GOODSWEN *et al.*, 2013).

Anticorpos policlonais contra antígenos totais de *N. caninum* são comumente utilizados em IHC para detecção do parasito nos tecidos (CABRAL *et al.*, 2009), porém para melhorar a acurácia desta técnica, anticorpos policlonais (pAb) e monoclonais (mAb) contra antígenos específicos de *N. caninum* são alternativas para se reduzir reações cruzadas (DUBEY; SCHARES, 2006). Anticorpos produzidos contra antígenos de superfície

(NcSRS2) e de grânulos densos (NcGRA7), presentes tanto em taquizoítos quanto em bradizoítos, mostraram-se eficientes na detecção de *N. caninum* em IHC, reduzindo os resultados falso-positivos, melhorando a sensibilidade e especificidade da técnica (UZEDA *et al.*, 2013).

4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma ferramenta muito importante para detecção do *N. caninum*, tendo como vantagens ser uma técnica rápida e possuir alta sensibilidade e especificidade. Porém, ainda é uma técnica de valor elevado (TRAMUTA *et al.*, 2011). A PCR pode ser aplicada para o diagnóstico, para o sequenciamento, quantificação de DNA do protozoário e identificação de novos hospedeiros do parasito (BARTLEY *et al.*, 2013; DUBEY *et al.*, 2011).

Vários formatos de PCRs vêm sendo aplicados para o diagnóstico da neosporose (Tabela 2), tais como o PCR em Tempo Real (PEREIRA *et al.*, 2014), Nested PCR (SANTOS *et al.*, 2010) e Multiplex PCR (AL-QASSAB *et al.*, 2010; REISBERG *et al.*, 2013; TRAMUTA *et al.*, 2011), os quais podem utilizar tecidos de fetos abortados, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, sangue, fezes, leite, sêmen, etc (PEREIRA *et al.*, 2014).

Os PCRs desenvolvidos podem ser utilizados para caracterização e identificação de *N. caninum* em amostras suspeitas, utilizando-se primers específicos para os isolados NC-1, NC-2, NC-3, NC-Liverpool, Nc-Goiás, BPA-1, BPA-6, Nc-SweB1, NcNZ1, NcNZ2, NcNZ3, WA-K9, JAP1, NC-Beef (Tabela 2), os quais são úteis no diagnóstico e epidemiologia da doença (COBADIOVA *et al.*, 2013).

As sequências de DNA que codificam para o RNA ribossomal (rDNA), 18S rDNA e 28S rDNA já foram bastante utilizadas, bem como o gene 14-3-3 que possui elevado grau de conservação das sequências de aminoácidos e evolutivamente mantido em eucariotos (DUBEY; SCHARES, 2006). No entanto, a região ITS1 do rRNA e o gene NC-5 foram os

mais comumente utilizados nos últimos anos (Tabela 2). A região gênica ITS1 (espaçadores internos transcritos) mostra-se um eficiente alvo por apresentar diferenças nas sequências de aminoácidos que permitem a identificação espécie específica do parasito (BARTLEY *et al.*, 2013; COBADIOVA *et al.*, 2013; GONDIM *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; TRUPPEL *et al.*, 2010) e o gene NC-5 por apresentar uma sequência repetida de DNA no genoma de *N. caninum* (ALMERIA *et al.*, 2010; COBADIOVA *et al.*, 2013; DUBEY *et al.*, 2011; FUEHRER *et al.*, 2010; ISHIGAKI *et al.*, 2012; KHODAKARAM-TAFTI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012; TRUPPEL *et al.*, 2010; YAO *et al.*, 2009).

Tabela 2

PCRs utilizados para detecção do protozoário *N. caninum* em diferentes espécies animais

DNA alvo	Primers	Tipo de PCR	Espécie	Amostra	Referência
Gene Nc-5	Nc5fwd, Nc5rev	Real Time PCR (TaqMan)	Ovina	Tecidos fetais	PEREIRA <i>et al.</i> (2014)
Gene Nc-5 ITS1	Np6, Np21 NN1, NN2 Np1, Np2	One-Step PCR Two-step Nested PCR	Urso pardo Europeu	Músculo, fígado e baço	COBADIOVA <i>et al.</i> (2013)
ITS1	NN1, NN2 Np1, Np2	Two-step Nested PCR	Carnívoros selvagens	Múltiplos órgãos e tecidos	BARTLEY <i>et al.</i> (2013)
Gene Nc-5	Np6plus, Np21plus Np7, Np6plus,	Two-step semi- Nested PCR	Cães	Líquido cefalorraquidiano	ISHIGAKI <i>et al.</i> (2012)
Gene Nc-5	Np6, Np21	One-Step PCR	Frangos	Pulmão, coração, cérebro, membrana corioalantóide e articulações	KHODAKARAM- TAFTI <i>et al.</i> (2012)
Gene Nc-5	Np4, Np7	One-Step PCR	Bovina	Útero e sangue	SILVA <i>et al.</i> (2012)
Gene Nc-5	Np6plus, Np21plus Np7, Np10	Two-step Nested PCR	Lobo cinzento	Fezes	DUBEY <i>et al.</i> (2011)
Gene Nc-5	Np6plus, Np21plus	One-Step PCR	Ratazanas	Cérebro	FUEHRER <i>et al.</i> (2010)
ITS1	JS4, CT2b CT1, CT2	Two-step Nested PCR	Bovina	Cérebro e coração	SANTOS <i>et al.</i> (2010)
Gene Nc-5	Np21, Np6	One-Step PCR	Capivara	Fígado, linfonodos,	TRUPPEL <i>et al.</i> (2010)

ITS1	Np21, Np4 Np7, Np4 ITS5, ITS2			baço e coração	
Gene Nc-5	Np6plus, Np21plus	One-step quantitative PCR	Bovina	Cérebro, medula espinhal, placenta e tecidos fetais	ALMERIA <i>et al.</i> (2010)
ITS1	JS4, CT2b CT1, CT2	Two-step Nested PCR	Pardal	Coração e cérebro	GONDIM <i>et al.</i> (2010)
Gene Nc-5	Np6plus, Np21plus Np9, Np10	Two-step Nested PCR	Bovina	Tecidos fetais e sangue	YAO <i>et al.</i> (2009)

198

199 **4.4 Ensaios sorológicos**

200 A infecção por *N. caninum* estimula a resposta imune humoral do hospedeiro, sendo
 201 possível a detecção de anticorpos contra antígenos imunodominantes (HIASA *et al.*, 2012a)
 202 presentes na forma de taquizoíto ou bradizoíto, sendo possível estabelecer assim o estágio
 203 agudo ou crônico da infecção (DONG *et al.*, 2013; DUBEY; LINDSAY, 2006).

204 Os níveis de anticorpos de classe IgM específicos para neosporose já podem ser
 205 detectados após duas semanas de infecção, caracterizando a infecção aguda. Porém,
 206 diminuem consideravelmente até quatro semanas, sendo difícil a detecção destes anticorpos
 207 após este período (DION *et al.*, 2011). Os níveis de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2), são baixos
 208 nos primeiros dias da infecção, aumentando durante as primeiras semanas, indicando a fase
 209 crônica da doença (ALMERIA *et al.*, 2009). Animais naturalmente infectados e infecções
 210 experimentais demonstraram altos níveis de anticorpos IgG após 6 meses da infecção primária
 211 (GOODSWEN *et al.*, 2013; DUBEY; SCHARES, 2011).

212 Devido a esta resposta imunológica poder ser detectada através de testes sorológicos,
 213 os diagnósticos indiretos possuem grandes vantagens, como serem utilizados no *antemortem*
 214 dos animais e também por fornecerem informações quanto ao estágio da doença (HIASA *et*
 215 *al.*, 2012a; TAKASHIMA *et al.*, 2013).

216

4.4.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

A técnica sorológica utilizada como padrão ouro para o diagnóstico da neosporose é a imunofluorescência indireta (IFI) (PIAGENTINI *et al.*, 2012), sendo o primeiro ensaio sorológico descrito para o diagnóstico da doença (DUBEY *et al.*, 1988). No entanto, para sua execução se faz necessário a manutenção de linhagens celulares infectadas com taquizoítos (DUBEY; SCHARES, 2006), o que representa um alto custo no diagnóstico. Além disso, a subjetividade do resultado é diretamente dependente da experiência do executor do teste, e sua especificidade pode ser prejudicada devido à reação de anticorpos presentes em amostras positivas contra outros protozoários (HE *et al.*, 2013; RISCO-CASTILLO *et al.*, 2011; YBANES *et al.*, 2013).

Apesar das desvantagens, a IFI é a técnica padrão para o diagnóstico da neosporose, o que justifica o seu uso na maior parte dos trabalhos realizados com o objetivo de identificar a soroprevalência da doença (Tabela 3).

Entre os estudos de prevalência da neosporose no Brasil, podemos destacar que a maior parte dos estudos foi desenvolvido com o intuito de identificar a doença nas populações de ovinos e bovinos, no entanto, a identificação da prevalência em outras espécies animais também foram relatadas (Tabela 3).

No ano de 2010 foi descrito pela primeira vez a presença de anticorpos contra *N. caninum* em suínos no Brasil (AZEVEDO *et al.*, 2010) e os pardais (*Passer domesticus*) foram as primeiras espécies de aves sinantrópicas diagnosticadas com o protozoário, sugerindo possível hospedeiro intermediário (GONDIM *et al.*, 2010).

Em pequenos ruminantes (ovelhas e cabras) a positividade tem sido associada à idade dos animais, sendo maior a ocorrência em animais mais velhos (TEMBUE *et al.*, 2011). Já em bovinos, a maior frequência está associada às criações de gado de leite (GOODSWEN *et al.*, 2013).

Estudos em diferentes regiões do Brasil relatam soroprevalências diversas entre animais da mesma espécie. Os autores TEMBUE *et al.* (2011) encontraram uma soroprevalência de 64,2% para neosporose em ovinos no estado de Pernambuco, enquanto que SOARES *et al.* (2009) detectaram 1,8% de sororeatividade para a doença nesta espécie animal no estado do Rio Grande do Norte. Pode-se sugerir que estas diferenças ocorram devido a variações nas regiões do estudo, ao ponto de corte utilizado no diagnóstico, à presença de antecedentes de abortos, bem como nas condições de higiene e manejo entre as criações estudadas.

Um formato de imunofluorescência direta utilizando anticorpos específicos contra *N. caninum* para detecção do parasito em fluidos biológicos e tecidos pode ser uma estratégia para a redução da reação cruzada com *T. gondii*. DE SA *et al.* (2013) obtiveram um pAb gerado contra a proteína de membrana codificada pelo gene *NcSRS2*, conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) e este foi capaz de imunomarcas o complexo apical de isolados de *N. caninum* sem apresentar reação com *T. gondii*, sugerindo seu uso potencial na detecção direta do parasito.

Tabela 3

Soroprevalência da neosporose em estados brasileiros.

Cidade – Estado	Formato	Hospedeiro	Nº de amostras	Soroprevalência %	Referência
MG ^a	IFI	Caprino	667	10,7	ANDRADE <i>et al.</i> (2013)
Caçapava – SP	IFI	Bovino	2750	3,32 – 11,71 ^b	CARDOSO <i>et al.</i> (2012)
Lagoinha – SP	IFI	Bovino	1291	3,9 – 22,06 ^b	
Pindamonhangaba – SP	IFI	Bovino	2154	28,57 – 37,10 ^b	
Avaré - SP	ELISA indireto	Bovino	615	21,6 – 38,9 ^b	PIAGENTINI <i>et al.</i> (2012)
Tapirapé e Karajá ^c	IFI	Canino	325	9,8	MINERVINO <i>et al.</i> (2012)

Meceió – AL	IFI	Canino	237	4,2	DE SOUSA <i>et al.</i> (2012)
Botucatu e Pardinho – SP	IFI	Ovino	382	12,8	LANGONI <i>et al.</i> (2011)
Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga - SP	IFI	Ovino Canino	1497 42	8,0 4,08	MACHADO <i>et al.</i> (2011)
Ibimirim - PE	IFI	Caprino Ovino	319 81	26,6 64,2	TEMBUE <i>et al.</i> (2011)
Curitiba - PR	IFI	Canino	147	11,56	PLUGGE <i>et al.</i> (2011)
Uberlândia – MG	IFI	Ovino	155	47,1	ROSSI <i>et al.</i> (2011)
Cordeirópolis, Valparaíso, Andradina, Cosmorama, São Paulo e Ribeirão Preto – SP	IFI	Capivara	63	3,0	VALADAS <i>et al.</i> (2010)a
PA ^d	IFI	Canino	129	12,4	VALADAS <i>et al.</i> (2010)b
BA e PE ^e	PCR	Pardal	40	7,5	GONDIM <i>et al.</i> (2010)
Patos - PB	IFI	Suino	130	3,1	AZEVEDO <i>et al.</i> (2010)
AL ^f	IFI	Ovino	343	9,6	FARIA <i>et al.</i> (2010)
Zona Rural do Distrito Federal – DF ^g	IFI	Ovino	1028	8,81	UENO <i>et al.</i> (2009)
Mossoró - RN	IFI	Ovino	409	1,80	SOARES <i>et al.</i> (2009)

^a Soros coletados em 90 rebanhos de 90 municípios do estado de Minas Gerais.

^b Soros coletados em dois períodos diferentes, o primeiro resultado representa a primeira coleta e o segundo resultado representa a segunda coleta.

^c Comunidades indígenas da Amazônia brasileira.

^d 72 amostras são provenientes de 34 propriedades rurais de 20 municípios do estado do Pará e 57 amostras foram coletadas pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Santarém e cedidas para o trabalho.

^e As aves foram capturadas em 3 municípios no estado da Bahia (Serrinha, Mata de São João e Conceição de Feira) e em Pernambuco, próximo a empresas aviárias. *O trabalho não identifica regiões do estado de PE.

^f Soros coletados em 26 rebanhos de 23 municípios do estado de Alagoas.

^g Soros cedidos pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), proveniente de 32 fazendas de criações de ovinos da zona rural do Distrito Federal.

4.4.2 Kits comerciais

Vários testes sorológicos comerciais para detecção de anticorpos contra *N. caninum* estão disponíveis comercialmente, sendo a grande maioria no formato de ensaios imunoenzimáticos (*enzyme-linked immuno sorbent assay* - ELISA) indiretos, os quais utilizam, quase que na totalidade, um lisado de taquizoítos ou antígenos nativos purificados para sensibilização das placas de poliestireno (Tabela 4). O uso de antígenos nativos ou totais diminui a especificidade do teste devido às reações cruzadas com outros coccídeos (YBANEZ *et al.*, 2013). Portanto, a busca por alvos proteicos específicos, exclusivas de *N. caninum*, parece ser promissora para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico sensíveis e específicos.

Em estudo realizado em 2007, os autores compararam a técnica padrão ouro com diferentes tipos de ensaios comerciais, e concluíram que de acordo com o desempenho dos testes, estes podem ser uma boa alternativa de triagem para a detecção de anticorpos contra o patógeno (WAPENAAR *et al.*, 2007).

Tabela 4

Testes comerciais mais utilizados para o diagnóstico da neosporose.

Teste	Formato	Antígeno	Fabricante	Referência
IDEXX <i>Neospora</i> X2 Ab test kit	ELISA Indireto	Não informa	IDEXX Laboratories	ASMARE <i>et al.</i> (2013) WILKOWSKY <i>et al.</i> (2011)
IDEXX <i>Neospora</i> Ab test kit	ELISA Indireto	Não informa	IDEXX Laboratories	BYREM <i>et al.</i> (2012) BIEN <i>et al.</i> (2012)
CHEKIT <i>Neospora</i> Dr. Bommeli/IDEXX	ELISA Indireto	Taquizoítos lisados por detergentes	IDEXX Laboratories	SANHUEZA <i>et al.</i> (2013)
HerdChek anti- <i>Neospora</i> IDEXX	ELISA Indirteo	Taquizoítos lisados por sonicação	IDEXX Laboratories	GHALMI <i>et al.</i> (2014) VANLEEUEWEN

				<i>et al.</i> (2010) ALMERÍA <i>et al.</i> (2010) GHALMI <i>et al.</i> (2009)
<i>Neospora caninum</i> Antibody Detection Kit (BIO K 192)	ELISA Sanduiche	Antígeno purificado de taquizoítos – NcSRS2	Bio-X Diagnostics SPRL	GHALMI <i>et al.</i> (2014) GONZÁLEZ- WARLETA <i>et al.</i> (2011) GHALMI <i>et al.</i> (2009)
CIVTEST BOVIS <i>NEOSPORA</i>	ELISA Indireto	Taquizoítos lisados por sonicação	HIPRA	SILVA <i>et al.</i> (2012)
SVANOVIR <i>Neospora</i> -Ab ELISA	ELISA Indireto	Antígenos associados a complexos imunoestimulantes (ISCOM)	SVANOVA Biotech AB	SELAHI <i>et al.</i> (2013) MORAVEJI <i>et al.</i> (2012) LOOBUYCK <i>et al.</i> (2009)
ID Screen <i>Neospora caninum</i> Indirect	ELISA Indireto	Extrato purificado de <i>N. caninum</i>	ID-VET, Innovative diagnostics	SPILOVSKA <i>et al.</i> (2009)

292 * Referências indicativas de trabalhos que fizeram uso dos respectivos kits comerciais.

293

294 4.4.3 Desenvolvimento de novos métodos sorológicos

295 Devido à falta de vacinas e tratamentos eficientes, a melhor estratégia de controle para
296 a neosporose é o diagnóstico. Os ensaios sorológicos possuem vantagens por utilizarem
297 amostras como soro e leite e, por tal motivo, muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de
298 se melhorar a acurácia dos testes ao utilizar proteínas específicas, novos formatos de ensaios,
299 que apresentem boa sensibilidade e especificidade e também ofereçam baixo custo e curto
300 tempo de realização (GHALMI *et al.*, 2014).

301 A maior parte dos trabalhos desenvolvidos nos últimos cinco anos utiliza proteínas
302 recombinantes específicas de *N. caninum* (Tabela 5), produzidas em sistema de expressão
303 procarioto *Escherichia coli*, com objetivo de minimizar os falsos positivos. Porém, o uso de
304 proteínas nativas purificadas de taquizoítos pode ser justificada devido ao uso da proteína em

sua conformação original, evitando-se as modificações indesejáveis que podem ocorrer nos sistemas de expressão heteróloga utilizados (HOSSEININEJAD *et al.*, 2010; UZEDA *et al.*, 2013). Sistemas de expressão alternativos vêm sendo descritos, como por exemplo, a utilização da levedura *Pichia Pastoris* (PINHEIRO *et al.*, 2013) e larvas de insetos (DONG *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013) os quais são capazes de realizar modificações pós-traducionais, resultando em proteínas recombinantes similares às nativas.

A purificação das proteínas também pode influenciar no desempenho dos ensaios desenvolvidos. Entre os marcadores utilizados para a purificação das proteínas recombinantes pode-se destacar a cauda de 6 aminoácidos de histidinas, a mais amplamente utilizada em vetores de expressão eucarioto e procarioto (ANDREOTTI *et al.*, 2009; BORSUK *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2011; WILKOWSKY *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2012; MORAVEJI *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2013; DE SA *et al.*, 2013; GHALMI *et al.*, 2014) e a proteína Glutathione – S – Transferase (GST) (HIASA *et al.*, 2012a; HIASA *et al.*, 2012b; HE *et al.*, 2013; YBANEZ *et al.*, 2013; TAKASHIMA *et al.*, 2013). No entanto, a fusão com esta proteína pode interferir no desempenho dos ensaios (BORSUK *et al.* 2011), sendo muitas vezes necessário a remoção da GST pelo uso de proteases, como a enteroquinase, por exemplo.

Os ensaios no formato ELISA indireto (Tabela 5) são os mais utilizados para o desenvolvimento de novos diagnósticos para a doença, por ser sensível e específico. Outros formatos de ELISAs foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a acurácia desta técnica, como por exemplo, o ELISA competitivo, ELISA de bloqueio e o ELISA de captura, os quais utilizam um anticorpo monoclonal ou policlonal que se ligue nos mesmos epítomos dos anticorpos presentes no soro do animal a ser testado. Além disso, estes ensaios não requerem a utilização de anticorpos secundários específicos para as diferentes espécies testadas e

anticorpos IgM e IgG podem ser detectados em um mesmo ensaio (YIN *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2013; DE SA *et al.*, 2013).

Um fato que chama a atenção é o de que a maioria dos testes realizados nos últimos cinco anos são para detecção de anticorpos contra *N. caninum* em bovinos (Tabela 5), sendo poucos trabalhos destinados ao diagnóstico da neosporose em outras espécies.

Os testes desenvolvidos descrevem uma sensibilidade mínima de 60% e máxima de 100% e especificidade em torno de 96% a 100%, mostrando que os resultados obtidos são bastante satisfatórios, podendo algum deles vir a substituir a técnica padrão ouro ou então ser um método de triagem eficiente.

Tabela 5

Testes sorológicos desenvolvidos para detecção de anticorpos contra *N. caninum*.

Formato	Características do teste	Referência
Aglutinação em partículas de látex (LAT)	Antígeno: Proteína recombinante NcGRA6; ensaio testado com 100 amostras de soros de cães e 100 amostras de soros de bovinos.	GHALMI <i>et al.</i> (2014)
ELISA sanduiche e ELISA competitivo	Antígeno: Proteína recombinante NcSAG1, produção de 2 anticorpos monoclonais testados em dois formatos de ELISAs utilizando soros de bovinos positivos e negativos para <i>N. caninum</i>	DONG <i>et al.</i> (2013)
ELISA indireto	Antígeno: Proteína recombinante Ncp40; ensaio testado com 682 amostras de soros de bovinos	HE <i>et al.</i> (2013)
ELISA indireto	Antígeno: Proteína recombinante truncada NcSRS2; ensaio testado com 139 amostras de soros de bovinos	PINHEIRO <i>et al.</i> (2013)
ELISA de bloqueio	Antígeno: Proteína recombinante truncada NcSRS2; produção de um anticorpo policlonal em coelho, testado em estudo piloto com 24 amostras de soros de bovinos	DE SA <i>et al.</i> (2013)
ELISA indireto	Antígeno: Proteína recombinante NcSAG1 e NcGRA7; ensaio testado com 129 amostras de soros de bovinos	TAKASHIMA <i>et al.</i> (2013)
Imunohistoquímica (IHC)	Antígeno: Taquizoítos purificados; produção de 1 anticorpo monoclonal que reconheceu uma proteína de 33kDa (NcGRA7), 2 monoclonais que reconheceram uma proteína de 38kDa (NcSRS2) e um anticorpo policlonal, utilizados para detecção do parasito em tecidos bovinos artificialmente preparados com cultivo de taquizoítos	UZEDA <i>et al.</i> (2013)
ELISA indireto	Antígeno: Proteína recombinante NcSUB1; ensaio testado com 79	YBANEZ <i>et al.</i>

	amostras de soros de vacas com histórico de aborto e 4 amostras de soro de vacas infectadas experimentalmente	(2013)
ELISA de captura	Antígeno: Proteína recombinante NcMIC10; produção de anticorpos policlonais em ovelhas e ratos, testado com 10 amostras de soros de cabras infectas experimentalmente	YIN <i>et al.</i> (2012)
Aglutinação em partículas de látex (LAT)	Antígeno: Proteína recombinante NcSAG1; ensaio testado com 164 amostras de soro de bovinos	MORAVEJI <i>et al.</i> (2012)
ELISA indireto	Antígeno: Proteínas recombinantes NcSRS2, NcSAG1 e NcGRA2; ensaio testado com 32 amostras de soros de bovinos	DONG <i>et al.</i> (2012)
ELISA indireto	Antígeno: Proteínas recombinantes NcGRA7 e NcSAG1; ensaio testado com 4 amostras de soros de bovinos infectados experimentalmente e com 58 amostras de soro de vacas com histórico de aborto	HIASA <i>et al.</i> (2012)a
ELISA indireto	Antígeno: Proteínas recombinantes NcGRA7 e NcPF; ensaio testado com 4 amostras de soros de cães infectados experimentalmente, 27 amostras de soro de cães com sintomas neurológicos e 143 amostras de soro de cães assintomáticos	HIASA <i>et al.</i> (2012)b
ELISA indireto	Antígeno: Proteína recombinante truncada NcSRS2; ensaio testado com 497 amostras de soros de bovinos	BORSUK <i>et al.</i> (2011)
<i>Immunoblot</i>	Antígeno: Proteína recombinante NcSAG4; ensaio testado com 52 amostras de soros de bovinos	HU <i>et al.</i> (2011)
<i>Antigen print immunoassay (APIA)</i>	Antígeno: Proteína recombinante NcSAG1; ensaio testado com 232 amostras de soro de bovinos	WILKOWSKY <i>et al.</i> (2011)
ELISA indireto	Antígeno: Proteína nativa purificada P38 (NcSRS2); ensaio testado com 233 amostras de soros de cães	HOSSEININEJAD <i>et al.</i> (2010)
ELISA indireto	Antígeno: Proteína recombinante NcSRS2; ensaio testado com 441 amostras de soros de ovinos	ANDREOTTI <i>et al.</i> (2009)

5 Conclusão

A neosporose causa perdas econômicas significativas em todo o mundo. Devido a esta problemática e a falta de vacinas e medicamentos eficientes para o combate da doença, é necessário se desenvolver métodos de detecção eficazes para o protozoário, pois o diagnóstico é a melhor estratégia de controle para esta parasitose. Novos métodos já foram descritos e muitos mostram-se promissores, evidenciando uma nova perspectiva no diagnóstico da

neosporose, e consequentemente a intervenção no manejo de um rebanho contendo animais positivos.

Referências

- ALTBUCH, J. A.; SCHOFIELD, M. J.; PORTER, C. A.; GAVIN, W. G. *Neospora caninum*: A successful testing and eradication program in a dairy goat herd. *J.Small Rum.Res.*, v.105, p. 341-344, 2012.
- AL-QASSAB, S.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J. A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. *Mol.Cell Probes*, v.24, n.1, p.20-26, 2010.
- ALMERIA, S.; ARAUJO, R.; TUO, W.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J.P.; GASBARRE, L.C. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Vet.Parasitol.*, v.169, n.3-4, p.304-311, 2010.
- ALMERIA, S.; NOGAREDA, C.; SANTOLARIA, P.; GARCIA-ISPIERTO, I.; YANIZ, J.L.; LOPEZ-GATIUS, F. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, v.130, n.1-2, p.35-42, 2009.
- ANDRADE, G.S.; BRUHN, F.R.; ROCHA, C.M.; DE SA, G.A.; GOUVEIA, A.M.; GUIMARAES, A.M. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. *Res.Vet.Sci.*, v.94, n.3, p.584-586, 2013.
- ANDREOTTI, R.; MATOS, M.F.; GONCALVES, K.N.; OSHIRO, L.M.; LIMA-JUNIOR, M.S.; PAIVA, F.; LEITE, F.L. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, v.18, n.2, p.19-22, 2009.
- ASMARE, K.; REGASSA, F.; ROBERTSON, L.J.; SKJERVE, E. Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. *Vet.Parasitol.*, v.193, n.1-3, p.85-94, 2013.
- AZEVEDO, S.S.; PENA, H.F.; ALVES, C.J.; GUIMARAES FILHO, A.A.; OLIVEIRA, R.M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, v.19, n.2, p.80-84, 2010.
- BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; CASPE, S.G.; MORE, G.; LISCHINSKY, L.; GOS, M.L.; LEUNDA, M.; CAMPERO, L.; MOORE, D.P.; SCHARES, G.; CAMPERO, C.M.; VENTURINI, M.C. *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and negative experimentally inoculated pregnant dams. *Parasitol.Res.*, v.112, n.7, p.2585-2592, 2013.

- 385 BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.E.; ZIMMER, I.A.; ROY, S.; KITCHENER, A.C.;
 386 MEREDITH, A.; INNES, E.A.; KATZER, F. Detection of *Neospora caninum* in wild
 387 carnivorans in Great Britain. *Vet.Parasitol.*, v.192, n.1-3, p.279-283, 2013.
- 388 BIEN, J.; MOSKWA, B.; BOGDASZEWSKI, M.; CABAJ, W. Detection of specific
 389 antibodies anti-*Neospora caninum* in the fallow deer (*Dama dama*). *Res.Vet.Sci.*, v.92, n.1,
 390 p.96-98, 2012.
- 391 BISHOP, S.; KING, J.; WINDSOR, P.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.; SLAPETA, J. The first
 392 report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep
 393 in New South Wales. *Vet.Parasitol.*, v.170, n.1-2, p.137-142, 2010.
- 394 BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing
 395 encephalomyelitis and myositis in dogs. *Parasitol.Res.*, v.70, p.271-274, 1984.
- 396 BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F.P.; PINTO, L.S.; SIMIONATTO, S.;
 397 HARTLEBEN, C.P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.; BERNE, M.E.
 398 Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in
 399 cattle. *Vet.Parasitol.*, v.177, n.1-2, p.33-38, 2011.
- 400 BYREM, T.M.; BARTLETT, P.C.; DONOHUE, H.; VOISINET, B.D.; HOUSEMAN, J.T.
 401 Performance of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora*
 402 *caninum* in whole and skim milk samples. *Vet.Parasitol.*, v.190, n.1-2, p.249-253, 2012.
- 403 CABRAL, A.D.; CAMARGO, C.N.; GALLETI, N.T.; OKUDA, L.H.; PITUCO, E.M.;
 404 FAVA, C.D. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology,
 405 immunohistochemistry, and nested-PCR. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, v.18, n.4, p.14-19, 2009.
- 406 CARDOSO, J.M.; AMAKU, M.; ARAUJO, A.J.; GENNARI, S.M. A longitudinal study of
 407 *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. *Vet.Parasitol.*, v.187, n.3-4,
 408 p.553-557, 2012.
- 409 COBADIOVA, A.; VICHOVA, B.; MAJLATHOVA, V.; REITEROVA, K. First molecular
 410 detection of *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). *Vet.Parasitol.*, v.197,
 411 n.1-2, p.346-349, 2013.
- 412 DE OLIVEIRA, U.V.; DE MAGALHAES, V.C.; ALMEIDA, C.P.; SANTOS, I.A.; MOTA,
 413 D.A.; MACEDO, L.S.; SILVA, F.L.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; MUNHOZ,
 414 A.D. Quails are resistant to infection with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet.Parasitol.*,
 415 v.198, n.1-2, p.209-213, 2013.
- 416 DE SA, G.L.; DE BORBA, P.D.; MONTE, L.G.; SINNOTT, F.A.; XAVIER, M.A.; RIZZI,
 417 C.; BORSUK, S.; BERNE, M.E.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C.P. Diagnostic
 418 Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*.
 419 *Curr.Microbiol.*, 2013.
- 420 DE SOUSA, M.E.; PORTO, W.J.; DE ALBUQUERQUE, P.P.; DE SOUZA NETO, O.L.;
 421 PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum*
 422 in dogs in the state of Alagoas, Brazil. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, v.21, n.3, p.287-290, 2012.

- 423 DION, S.; GERMON, S.; GUITON, R.; DUCOURNAU, C.; DIMIER-POISSON, I.
424 Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the
425 intracellular parasite *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.*, v.41, n.6, p.685-695, 2011.
- 426 DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; KOHSAKA, T.; IKE, K.; PARK, E.Y. Development of
427 two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and
428 application on the detection of N. caninum. *PLoS.One.*, v.8, n.1.
- 429 DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; PARK, E.Y. Development of a diagnostic method for
430 neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. *BMC.Biotechnol.*, p.12-
431 19, 2012.
- 432 DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.*, v.21, n.2, p.473-
433 483, 2005.
- 434 DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum*
435 infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission.
436 *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.
- 437 DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; KWOK, O.C.; FERREIRA, L.R.; CHOUDHARY, S.;
438 VERMA, S.K.; VILLENA, I.; BUTLER, E.; CARSTENSEN, M. Congenital transmission of
439 *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet.Parasitol.*, v.196, n.3-4,
440 p.519-522, 2013.
- 441 DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.;
442 MARTINS, J.; KWOK, O.C.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural
443 definitive host for *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.*, v.181, n.2-4, p.382-387, 2011.
- 444 DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants.
445 *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.*, v.22, n.3, p.645-671, 2006.
- 446 DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet.Parasitol.*, v.140, n.1-2,
447 p.1-34, 2006.
- 448 DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. *Vet.Parasitol.*,
449 v.180, n.1-2, p.90-108, 2011.
- 450 FARIA, E.B.; CAVALCANTI, E.F.; MEDEIROS, E.S.; PINHEIRO, J.W., Jr.; AZEVEDO,
451 S.S.; ATHAYDE, A.C.; MOTA, R.A. Risk factors associated with *Neospora caninum*
452 seropositivity in sheep from the State of Alagoas, in the northeast region of Brazil.
453 *J.Parasitol.*, v.96, n.1, p.197-199, 2010.
- 454 FUEHRER, H.P.; BLOSCHL, I.; SIEHS, C.; HASSL, A. Detection of *Toxoplasma gondii*,
455 *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus*
456 *arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western
457 Austria (Vorarlberg). *Parasitol.Res.*, v.107, n.2, p.469-473, 2010.
- 458 GALGUT, B.I.; JANARDHAN, K.S.; GRONDIN, T.M.; HARKIN, K.R.; WIGHT-
459 CARTER, M.T. Detection of *Neospora caninum* tachyzoites in cerebrospinal fluid of a dog
460 following prednisone and cyclosporine therapy. *Vet.Clin.Pathol.*, v.39, n.3, p.386-390, 2010.

- 461 GHALMI, F.; CHINA, B.; JENKINS, M.; AZZAG, N.; LOSSON, B. Comparison of different
462 serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and canine
463 sera. *J.Vet.Diagn.Invest*, 2014.
- 464 GHALMI, F.; CHINA, B.; KAIDI, R.; LOSSON, B. Evaluation of a SRS2 sandwich
465 commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum*
466 antibodies in bovine and canine sera. *J.Vet.Diagn.Invest*, v.21, n.1, p.108-111, 2009.
- 467 GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA,
468 R.A.; VILELA, S.M.; GONDIM, L.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows
469 (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Vet.Parasitol.*, v.168, n.1-2, p.121-124, 2010.
- 470 GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; CARRO-CORRAL, C.; MEZO,
471 M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle.
472 *Prev.Vet.Med.*, v.101, n.1-2, p.58-64, 2011.
- 473 GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and
474 evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect.Genet.Evol.*, v.13, p.133-
475 150, 2013.
- 476 HIASA, J.; KOHARA, J.; NISHIMURA, M.; XUAN, X.; TOKIMITSU, H.; NISHIKAWA,
477 Y. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum*
478 activation. *Vet.Parasitol.*, v.187, n.3-4, p.379-385, 2012a.
- 479 HIASA, J.; NISHIMURA, M.; ITAMOTO, K.; XUAN, X.; INOKUMA, H.; NISHIKAWA,
480 Y. Enzyme-linked immunosorbent assays based on *Neospora caninum* dense granule protein
481 7 and profilin for estimating the stage of neosporosis. *Clin.Vaccine Immunol.*, v.19, n.3,
482 p.411-417, 2012b.
- 483 HE, P.; LI, J.; GONG, P.; LIU, C.; ZHANG, G.; YANG, J.; TUO, W.; YANG, B.; ZHANG,
484 X. *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattle
485 neosporosis. *Parasitol.Res.*, v.112, p.2117-2120, 2013.
- 486 HOSSEININEJAD, M.; HOSSEINI, F.; MOSHARRAF, M.; SHAHBAZ, S.;
487 MAHZOUNIEH, M.; SCHARES, G. Development of an indirect ELISA test using an affinity
488 purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine *Neospora caninum* infection.
489 *Vet.Parasitol.*, v.171, n.3-4, p.337-342, 2010.
- 490 HOWE, L.; COLLETT, M.G.; PATTISON, R.S.; MARSHALL, J.; WEST, D.M.; POMROY,
491 W.E. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in
492 New Zealand. *Vet.Parasitol.*, v.185, n.2-4, p.64-71, 2012.
- 493 HU, J.; FERROGLIO, E.; TRISCIUOGLIO, A. Immunoblot diagnosis of infection with
494 *Neospora caninum* in cattle based on recombinant NcSAG4 Antigen. *Parasitol.Res.*, v.108,
495 p.1055-1058, 2011.
- 496 ISHIGAKI, K.; NOYA, M.; KAGAWA, Y.; IKE, K.; ORIMA, H.; IMAI, S. Detection of
497 *Nesopora caninum*-specific DNA from cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction in a
498 dog with confirmed neosporosis. *J.Vet.Med.Sci.*, v.74, n.8, p.1051-1055, 2012.
- 499 JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G.; AGUADO-MARTINEZ, A.; SALMAN, H.;
500 IRACHE, J.M.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L.M. Low efficacy of

- 501 NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-epsilon-caprolactone against
502 *Neospora caninum* infection in mice. *Vaccine*, v.30, n.33, p.4983-4992, 2012.
- 503 KHODAKARAM-TAFTI, A.; MANSOURIAN, M.; NAMAVARI, M.; HOSSEINI, A.
504 Immunohistochemical and polymerase chain reaction studies in *Neospora caninum*
505 experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. *Vet.Parasitol.*, v.188, n.1-2, p.10-
506 13, 2012.
- 507 LANGONI, H.; GRECA, H., Jr.; GUIMARAES, F.F.; ULLMANN, L.S.; GAIO, F.C.;
508 UEHARA, R.S.; ROSA, E.P.; AMORIM, R.M.; DA SILVA, R.C. Serological profile of
509 *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from Sao Paulo
510 State, Brazil. *Vet.Parasitol.*, v.177, n.1-2, p.50-54, 2011.
- 511 LOOBUYCK, M.; FROSSLING, J.; LINDBERG, A.; BJORKMAN, C. Seroprevalence and
512 spatial distribution of *Neospora caninum* in a population of beef cattle. *Prev.Vet.Med.*, v.92,
513 n.1-2, p.116-122, 2009.
- 514 MACHADO, G.P.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; PAES, A.C. Seroprevalence and risk
515 factors associated with neosporosis in sheep and dogs from farms. *Vet.Parasitol.*, v.182, n.2-
516 4, p.356-358, 2011.
- 517 MARTINS, J.; KWOK, O.C.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-
518 range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Vet.Parasitol.*, v.182, n.2-4, p.349-
519 351, 2011.
- 520 MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L.M.; AGUADO-MARTINEZ, A.;
521 ALVAREZ-GARCIA, G. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the
522 bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites. *Parasitology*, v.138, n.4, p.472-480,
523 2011.
- 524 MINERVINO, A.H.; CASSINELLI, A.B.; DE LIMA, J.T.; SOARES, H.S.; MALHEIROS,
525 A.F.; MARCILI, A.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti- *Neospora caninum* and anti-
526 *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from two different indigenous communities in the
527 Brazilian Amazon Region. *J.Parasitol.*, v.98, n.6, p.1276-1278, 2012.
- 528 MORAVEJI, M.; HOSSEINI, A.; MOGHADDAR, N.; NAMAVARI, M.M.; ESKANDARI,
529 M.H. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid
530 detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet.Parasitol.*, v.189, n.2-4, p.211-217,
531 2012.
- 532 PEREIRA, G.R.; VOGEL, F.S.F.; BOHRER, R.C.; NÓBREGA, J.E.; ILHA, G.F.; ROSA,
533 P.R.A.; GLANZNER, W.G.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; OLIVEIRA, J.F.C.;
534 GONÇALVES, P.B.D. *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in
535 experimentally infected pregnant heifers. *Veterinary Parasitology*, v.199, p.129-135, 2014.
- 536 PIAGENTINI, M.; MOYA-ARAUJO, C.F.; PRESTES, N.C.; SARTOR, I.F. *Neospora*
537 *caninum* infection dynamics in dairy cattle. *Parasitol.Res.*, v.111, n.2, p.717-721, 2012.
- 538 PINHEIRO, A.F.; BORSUK, S.; BERNE, M.E.; PINTO, L.S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.;
539 ROLLOF, B.C.; LEITE, F.P. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in
540 *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection.
541 *Pathog.Glob.Health*, v.107, n.3, p.116-121, 2013.

- 542 PLUGGE, N.F.; FERREIRA, F.M.; RICHARTZ, R.R.; DE, S.A.; DITTRICH, R.L.
 543 Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with
 544 neurological signs. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, v.20, n.3, p.202-206, 2011.
- 545 REICHEL, M.P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, L.F.; ELLIS,
 546 J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar
 547 question. *Int.J.Parasitol.*, v.43, n.2, p.133-142, 2013.
- 548 REISBERG, K.; SELIM, A.M.; GAEDE, W. Simultaneous detection of *Chlamydia* spp.,
 549 *Coxiella burnetii*, and *Neospora caninum* in abortion material of ruminants by multiplex real-
 550 time polymerase chain reaction. *J.Vet.Diagn.Invest*, v.25, n.5, p.614-619, 2013.
- 551 RISCO-CASTILLO, V.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; FERNANDEZ-GARCIA, A.;
 552 AGUADO-MARTINEZ, A.; JIMENEZ-RUIZ, E.; RODRIGUEZ-MARCO, S.; ALVAREZ-
 553 GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Identification of a gene cluster for cell-surface genes
 554 of the SRS superfamily in *Neospora caninum* and characterization of the novel SRS9 gene.
 555 *Parasitology*, p.1-11, 2011.
- 556 ROSSI, G.F.; CABRAL, D.D.; RIBEIRO, D.P.; PAJUABA, A.C.; CORREA, R.R.;
 557 MOREIRA, R.Q.; MINEO, T.W.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A. Evaluation of *Toxoplasma*
 558 *gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlandia, Minas Gerais State,
 559 Brazil, by different serological methods. *Vet.Parasitol.*, v.175, n.3-4, p.252-259, 2011.
- 560 SANHUEZA, J.M.; HEUER, C.; WEST, D. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum*
 561 and bovine viral diarrhea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev.Vet.Med.*,
 562 v.112, n.1-2, p.90-98, 2013.
- 563 SANTOLARIA, P.; ALMERIA, S.; MARTINEZ-BELLO, D.; NOGAREDA, C.; MEZO, M.;
 564 GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; PABON, M.; YANIZ, J.L.;
 565 LOPEZ-GATIUS, F. Different humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in
 566 purebred and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies. *Vet.Parasitol.*, v.178, n.1-2, p.70-76,
 567 2011.
- 568 SANTOS, S.L.; DE SOUZA, C.K.; GONDIM, L.Q.; DA SILVA, M.S.; UZEDA, R.S.; ABE-
 569 SANDES, K.; GONDIM, L.F. Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and
 570 *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. *Parasitol.Res.*,
 571 v.106, n.2, p.457-461, 2010.
- 572 SELAHI, F.; NAMAVARI, M.; HOSSEINI, M.H.; MANSOURIAN, M.; TAHAMTAN, Y.
 573 Development of a disperse dye immunoassay technique for detection of antibodies against
 574 *Neospora caninum* in cattle. *Korean J.Parasitol.*, v.51, n.1, p.129-132, 2013.
- 575 SHABBIR, M.Z.; NAZIR, M.M.; MAQBOOL, A.; LATEEF, M.; SHABBIR, M.A.;
 576 AHMAD, A.; RABBANI, M.; YAQUB, T.; SOHAIL, M.U.; IJAZ, M. Seroprevalence of
 577 *Neospora caninum* and *Brucella abortus* in dairy cattle herds with high abortion rates.
 578 *J.Parasitol.*, v.97, n.4, p.740-742, 2011.
- 579 SILVA, A.F.; RANGEL, L.; ORTIZ, C.G.; MORALES, E.; ZANELLA, E.L.; CASTILLO-
 580 VELAZQUEZ, U.; GUTIERREZ, C.G. Increased incidence of DNA amplification in
 581 follicular than in uterine and blood samples indicates possible tropism of *Neospora caninum*
 582 to the ovarian follicle. *Vet.Parasitol.*, v.188, n.1-2, p.175-178, 2012.

- 583 SOARES, H.S.; AHID, S.M.; BEZERRA, A.C.; PENA, H.F.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M.
 584 Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from
 585 Mossoro, Rio Grande do Norte, Brazil. *Vet.Parasitol.*, v.160, n.3-4, p.211-214, 2009.
- 586 SPILOVSKA, S.; REITEROVA, K.; KOVACOVA, D.; BOBAKOVA, M.; DUBINSKY, P.
 587 The first finding of *Neospora caninum* and the occurrence of other abortifacient agents in
 588 sheep in Slovakia. *Vet.Parasitol.*, v.164, n.2-4, p.320-323, 2009.
- 589 TAKASHIMA, Y.; TAKASU, M.; YANAGIMOTO, I.; HATTORI, N.; BATANOVA, T.;
 590 NISHIKAWA, Y.; KITO, K. Prevalence and Dynamics of Antibodies against NcSAG1 and
 591 NcGRA7 Antigens of *Neospora caninum* in Cattle during the Gestation Period.
 592 *J.Vet.Med.Sci.*, v.75, n.11, p.1413-1418, 2013.
- 593 TEMBUE, A.A.; RAMOS, R.A.; DE SOUSA, T.R.; ALBUQUERQUE, A.R.; DA COSTA,
 594 A.J.; MEUNIER, I.M.; FAUSTINO, M.A.; ALVES, L.C. Serological survey of *Neospora*
 595 *caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, v.20,
 596 n.3, p.246-248, 2011.
- 597 TRAMUTA, C.; LACERENZA, D.; ZOPPI, S.; GORIA, M.; DONDO, A.; FERROGLIO, E.;
 598 NEBBIA, P.; ROSATI, S. Development of a set of multiplex standard polymerase chain
 599 reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical
 600 samples. *J.Vet.Diagn.Invest.*, v.23, n.4, p.657-664, 2011.
- 601 TRUPPEL, J.H.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R.R.; VILANI, R.G.; REIFUR, L.;
 602 BOERGER, W.; DA COSTA-RIBEIRO, M.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Detection of
 603 *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. *Parasitol.Int.*, v.59, n.3,
 604 p.376-379, 2010.
- 605 UCHIDA, M.; NAGASHIMA, K.; AKATSUKA, Y.; MURAKAMI, T.; ITO, A.; IMAI, S.;
 606 IKE, K. Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite antigens,
 607 NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic infection.
 608 *Parasitol.Res.*, v.112, n.2, p.655-663, 2013.
- 609 UENO, T.E.; GONCALVES, V.S.; HEINEMANN, M.B.; DILLI, T.L.; AKIMOTO, B.M.;
 610 DE SOUZA, S.L.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and
 611 *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil.
 612 *Trop.Anim Health Prod.*, v.41, n.4, p.547-552, 2009.
- 613 UZEDA, R.S.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M.; MADRUGA, C.R.; AGUADO-
 614 MARTINEZ, A.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; GONDIM, L.F. Combination of
 615 monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*.
 616 *Vet.Parasitol.*, v.197, n.3-4, p.477-486, 2013.
- 617 VALADAS, S.; GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. Prevalence
 618 of antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*,
 619 *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in Capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from
 620 Sao Paulo State, Brazil. *J.Parasitol.*, v.96, n.3, p.521-524, 2010a.
- 621 VALADAS, S.; MINERVINO, A.H.; LIMA, V.M.; SOARES, R.M.; ORTOLANI, E.L.;
 622 GENNARI, S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*,
 623 and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Para State, Amazon, Brazil.
 624 *Parasitol.Res.*, v.107, n.2, p.453-457, 2010b.

- 625 VANLEEUEWEN, J.A.; HADDAD, J.P.; DOHOO, I.R.; KEEFE, G.P.; TIWARI, A.; SCOTT,
626 H.M. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled
627 Canadian dairy cows and herds. *Prev.Vet.Med.*, v.93, n.2-3, p.129-138, 2010.
- 628 WAPENAAR, W.; BARKEMA, H.W.; VANLEEUEWEN, J.A.; MCCLURE, J.T.;
629 O'HANDLEY, R.M.; KWOK, O.C.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.
630 Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle.
631 *Vet.Parasitol.*, v.143, n.2, p.166-173, 2007.
- 632 WESTON, J.F.; HEUER, C.; PARKINSON, T.J.; WILLIAMSON, N.B. Causes of abortion
633 on New Zealand dairy farms with a history of abortion associated with *Neospora caninum*.
634 *N.Z.Vet.J.*, v.60, n.1, p.27-34, 2012a.
- 635 WESTON, J.F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N.B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed
636 tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle.
637 *Prev.Vet.Med.*, v.103, n.2-3, p.136-144, 2012b.
- 638 WILKOWSKY, S.E.; BAREIRO, G.G.; MON, M.L.; MOORE, D.P.; CASPE, G.;
639 CAMPERO, C.; FORT, M.; ROMANO, M.I. An applied printing immunoassay with
640 recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle.
641 *J.Vet.Diagn.Invest*, v.23, n.5, p.971-976, 2011.
- 642 YAO, L.; YANG, N.; LIU, Q.; WANG, M.; ZHANG, W.; QIAN, W.F.; HU, Y.F.; DING, J.
643 Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested
644 PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology*, v.136, n.11,
645 p.1251-1256, 2009.
- 646 YBANEZ, R.H.; TERKAWI, M.A.; KAMEYAMA, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.
647 Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis
648 of *Neospora caninum* infection. *Clin.Vaccine Immunol.*, v.20, n.10, p.1617-1622, 2013.
- 649 YIN, J.; QU, G.; CAO, L.; LI, Q.; FETTERER, R.; FENG, X.; LIU, Q.; WANG, G.; QI, D.;
650 ZHANG, X.; MIRAMONTES, E.; JENKINS, M.; ZHANG, N.; TUO, W. Characterization of
651 *Neospora caninum* microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnostic
652 marker for neosporosis. *Vet.Parasitol.*, v.187, n.1-2, p.28-35, 2012.
653

4 ARTIGO 2

DEVELOPMENT OF A BLOCKING ELISA USING THE RECOMBINANT PROTEIN NcSRS2 FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE NEOSPOROSIS

Artigo a ser submetido ao periódico *Current Microbiology*.

**DEVELOPMENT OF A BLOCKING ELISA USING THE RECOMBINANT PROTEIN
NcSRS2 FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE NEOSPOROSIS**

**Francine Alves Sinnott¹, Leonardo Garcia Monte¹, Gizele Lima Sá¹, Diene de Borba
Pacheco¹, Sibele Borsuk², Fabio Pereira Leivas Leite³, Renato Andreotti⁴, Cláudia Pinho
Hartleben^{1,*}**

¹Laboratório de Imunodiagnóstico, ²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas and

³Laboratório de Bacteriologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento

Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Gado de Corte, Campo Grande,
Mato Grosso do Sul, Brazil

* Corresponding author (mailing address): Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de
Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas,
CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil - P.O. Box 354. Phone: + 55 (53) 32757350

E-mail: hartlebenclaudia@gmail.com

Abstract

The causative agent of neosporosis, *Neospora caninum*, is an obligate intracellular parasite, which can infect a variety of hosts (ruminants, horses, dogs and wild animals). Clinical signs are of little help and the low efficiency in early detection laboratory makes the neosporosis the major cause of abortion in livestock throughout the world. The reference method for serodiagnosis of bovine neosporosis is the indirect fluorescent-antibody test (IFAT). However, the IFAT is based on whole-cell extracts from *N. caninum*, and therefore, there is a risk of false-positive results due to similar morphologic characteristics between *N. caninum* and *Toxoplasma gondii*. In addition, the IFAT is laborious, has subjectiveness in the scoring of results and does not lend itself to large-scale investigations. To achieve a reliable diagnosis many antigens have been studied. Among these antigens, the immune-dominant surface protein NcSRS2, expressed in both bradyzoites and tachyzoites forms, represent a useful diagnostic tool to detection of *N. caninum* antibodies in serum samples. In this context, we developed a blocking *enzyme-linked immunosorbent assay* (b-ELISA) using NcSRS2 in its recombinant form (rNcSRS2) and a polyclonal antibody generated against rNcSRS (pAb/rNcSRS2). The assay was evaluated with 152 bovine samples sera (81 positive and 71 negative) previously tested by IFAT from farms with reproductive disorders. The positive serum samples for *N. caninum* were able to prevent mostly (80) the binding of pAb/rNcSRS2 to absorbed rNcSRS2 antigen. The b-ELISA when compared with IFAT showed 98.7% sensitivity and 88.7% specificity (93.7% accuracy). The method described in this paper should be a useful tool for the serodiagnosis of neosporosis since many problems are associated with the detection of *N. caninum*.

Keywords: *Neospora caninum*, neosporosis, ELISA, NcSRS2, diagnostic

Short Communication

Neospora caninum is an intracellular apicomplexan coccidian parasite closely related to *Toxoplasma gondii* members of the Canidae family are the definitive hosts for the parasite, while diverse animal species such as cattle, sheep, horse, goat and pig are intermediate hosts [6,10,12,16]. The neosporosis is a major cause of abortion in dairy and beef cattle worldwide [2,5] resulting in economically losses, which exceeding millions of dollars per year [21]. Diagnosis of neosporosis can be achieved using histology, immunohistochemical staining, polymerase chain reaction (PCR) and serological methods [13]. Serological tests have the advantage that they can be applied in antemortem and the accepted reference method for serological diagnosis is indirect fluorescent-antibody test (IFAT) [10]. However, this method uses whole tachyzoite antigen and may result in antibodies cross-reactive to closely related members of the phylum Apicomplexa, such as *T. gondii* and *Sarcocystis* spp., which also infect cattle and have morphological similarities and immunological relatedness [14]. Moreover, the IFAT has subjectiveness in the scoring of results, is labor-intensive, and does not lend itself to large-scale investigations [4]. In recent years, alternative methods like immunoblotting, the direct agglutination test, the latex agglutination test and a variety of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) [7,8,17,18,20,25,26] have been described, to improve the diagnosis of disease. In order to achieve a reliable diagnosis, many proteins of *N. caninum* have been studied [9], including dense-granule antigens NcGRA2, NcGRA6 and NcGRA7 [9,14,22,24], serine protease NcSUB1 [25], microneme antigen NcMIC10 [26] and the surface proteins NcSAG1, NcSAG4 and NcSRS2 [1,7,17,20]. Among these proteins, the NcSRS2 is an immune-dominant surface protein present in bradyzoites and tachyzoites of *N. caninum*, and the usefulness of this protein in the in specific serological diagnosis of neosporosis has been reported [15,24]. In this study we describe the development of blocking

ELISA (b-ELISA) using NcSRS2 in the recombinant form (rNcSRS2) and a polyclonal antibody (pAb) generated against this single antigen for serodiagnosis of bovine neosporosis.

A total of 152 bovine serum samples (81 positive and 71 negative) previously collected from farms with reproductive disorders such as abortions, premature births, and stillbirths were obtained from the sera bank of the Laboratory of Parasitology, Federal University of Pelotas, RS, Brazil. Normal calf serum (negative reference sera) and sera samples from bovine positive for toxoplasmosis (n=10) were used in the standardization steps. All the samples were tested by the IFAT, analyzed at a dilution of 1:50, defined as the cut-off point, using the method previously described [19,23]. Indirect immunofluorescence using tachyzoites of *T. gondii* was carried on with all sera samples.

The vector pET100/D TOPO/NcSRS2 previously constructed [4], containing the antigenic domain of NcSRS2 gene, located in the distal C - terminal two thirds of the molecule, was used to transform *Escherichia coli* BL21 Star (DE3). The *E. coli* cells in the log phase ($OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,8$) were treated with 0.75 - mM isopropyl α -D-thiogalactoside (IPTG) for 3 h at 37 °C to induce expression of fused fragments of NcSRS2 protein. The protein was solubilized in a buffer containing 0.2% N-lauroyl sarcosine. rNcSRS2 expression was confirmed by 12% SDS-PAGE and Western Blot (WB) using an anti-6 $\times$ HIS alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich, USA). rNcSRS2 was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using Ni²⁺ Sepharose HisTrap columns, following the manufacturer's instructions (GE Healthcare, USA). Purified rNcSRS2 was dialyzed against PBS (containing 0.1% glycine; pH 8.0) for approximately 16 h at 4 °C. Fractions of purified rNcSRS2 were analyzed by 12% SDS-PAGE in reducing conditions, and final concentrations were determined using bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) with bovine serum albumin as a standard.

Purified rNcSRS2 and an unrelated recombinant protein (negative control) were used for WB analysis of negative pool (n=71) and a positive pool (n=81) bovine sera by IFAT. The samples were mixed with SDS gel-loading buffer (100-mM Tris-HCl at pH 6.8, 100-mM 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol) under reducing conditions. The samples were subjected to SDS-PAGE, after which the proteins in the gel were electrically transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, UK). The membrane was blocked with PBS containing 1% fetal bovine serum (FBS) for 1 h at 37 °C and incubated with cattle sera diluted at 1:100 with PBS-T at 37 °C for 1 h. The membrane was washed five times with PBS-T and incubated with horseradish peroxidase-conjugated antibovine IgG (Sigma Chemicals, USA) diluted at 1:4000 with PBS at 37 °C for 1 h. The reacting bands were revealed using 3,3'-tetrahydrochloride (DAB) and H₂O₂.

Two 6-month-old male New Zealand rabbits were immunized with rNcSRS2 following a 30-day adaptation period. For each rabbit, the immunization dose contained 100 µg rNcSRS2. The first dose was emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) and the subsequent immunizations (days 7, 14, 21, and 28) in incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA). After the last immunization, indirect ELISA was used to determine the rNcSRS2 antibody titer and the hyperimmune serum obtained was purified by affinity chromatography using a protein A-Sepharose CL-4B column (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's instructions. Purification efficiency was evaluated by 10% SDS-PAGE. Polyclonal antibody concentration and titration was determined by spectrophotometry at 280 nm and indirect NcSRS2 ELISA. The animals used in this study were treated in accordance with the guidelines recommended by Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

To evaluate the b-ELISA, polystyrene microtiter plates (Nunc Polysorp; Nalge Nunc International, Rochester, USA) were coated with 25ng of rNcSRS2 per well for 1 h at 37 °C.

The plates were blocked at 4 °C overnight with PBS 1% FBS and washed five times with PBS-T. Then, fifty microliters of each bovine serum (81 positive and 71 negative) diluted 1:2 with PBS 1% FBS were added to the plates and incubated for 1 h at 37 °C. The wells were washed five times with PBS-T and incubated with anti-NcSRS2 antibodies (pAb/rNcSRS2) diluted 1:32,000 for 1 h at 37 °C. The wells were treated with the horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit antibody for 1 h at 37 °C. The substrate solution (0.4 mg/mL o-phenylenediamine and 0.03% H₂O₂ in 0.1 M citrate buffer, pH 4.0) was added to the wells for the colorimetric reaction. The reactions were stopped by adding 2N H₂SO₄, and the optical density (OD) was measured at 492 nm using the VICTOR X5 Multilabel Plate Reader. Each plate included positive pool (n=81) and negative pool (n=71) control sera, and the negative reference sera. All the samples were evaluated in duplicate (1:2). The concentrations for the reagents used in the various steps of the ELISA procedures (*i.e.*, negative and positive control sera, pAb/rNcSRS2, negative reference sera, and the coating antigen) were established by varying the concentration of the reagent added during a particular step while maintaining the conditions for all the other steps at a constant, except for the colorimetric reaction step. The percent inhibition for each sample was determined by comparing the OD mean of test sera to the OD mean of negative reference sera using the following formula: percent inhibition = 100 - [(OD of test sera /OD of negative reference sera) x 100] [3]. The cut-off value was determined as the percent inhibition mean ± standard deviation (SD) of negative control sera (1:2) previously confirmed by IFAT. These experiments were repeated three times. The comparison between IFAT and b-ELISA assays was performed using Chi-square (χ^2) test (Statistics, version 8.0) and the concordance determined using the Kappa coefficient (Epi InfoTM 7 version).

This study describes the development of a blocking ELISA for the detection of bovine anti-NcSRS2 antibodies. The NcSRS2 have been identified as major surface antigen proteins

of *N. caninum*, and was demonstrated to be immune-dominant and involved in interactions between the tachyzoite and the host cell [9]. Purification of truncated rNcSRS2 from *E. coli* by affinity chromatography was efficient, resulting in 1 mg/L. A band of high intensity and of the expected size, ≈ 30 kDa, was observed when the fractions collected in the purification process were submitted to SDS-PAGE and WB using an anti-6 $\times$ HIS (data not shown). In order to access the specificity of NcSRS2 protein with the sera from cattle infected with *N. caninum*, we performed a WB analysis using an unrelated protein and positive and negative pooled bovine sera. The reaction of the rNcSRS2 with the sera was observed only in the positive sera. The purification of pAb/rNcSRS2 was efficient and reached a titer of 128,000 in indirect ELISA (data not shown).

Out of 81 positive sera confirmed by IFAT, 80 reacted in b-ELISA (Fig. 2) and 8 from 71 IFAT negative samples presented positive reaction in b-ELISA (Fig. 1). No reaction was observed in sera positive for toxoplasmosis (data not shown). The indirect IFAT was first applied to the diagnosis of neosporosis and has since been widely used as a standard test for serological analysis [11]. However, an intrinsic limitation of IFAT is the subjective interpretation of the results and the difficulties in ensuring standardization between laboratories. Moreover, tachyzoite fixed could cross-reacted with antibodies against other coccidian, resulting in the misdiagnosis of neosporosis [9].

The b-ELISA developed in this study showed an accuracy of 93.7% relative to the IFAT. Among 152 samples tested by b-ELISA, 98.7% sensitivity and 88.7 % specificity relative to positive and negative sera tested by IFAT were obtained (Table 1). Other studies based on ELISA for diagnosis of bovine neosporosis reported similar test sensitivity [1,15,20]. The specificity of b-ELISA was 88.7% relative to IFAT and 8 IFAT negative serum samples were able to inhibit pAb/rNcSRS2 specific attachment (Fig. 1). Those false b-ELISA positive results could be due to sera IgM antibodies which are undetectable by IFAT. In

comparison to IFAT, the b-ELISA had an excellent agreement ($\kappa = 0.8803$) and no significant difference was found between tests ($P = 0.4191$).

ELISAs formats have been applied in the diagnosis of infectious diseases due its sensitivity and quickly performance. Yet, ELISAs can be easily automated, allowing the analysis of a large number of samples in one round, which offer advantages over IFAT [4]. The indirect ELISA format has been reported for the detection of antibodies against *N. caninum* animal sera [22]. However, despite of sensitivity and specificity of those tests, they use species-specific antibodies to tested sera, disabling other antibodies class detection than IgG, besides the possibility of nonspecific reactions between immunoglobulins [7]. In this context, blocking ELISA to detect antibodies to NcSRS2 protein can provide an additional level of specificity because the antibody is directed to a specific epitope from the organism, also being possible to detect different antibody class in a single assay [3]. In conclusion, the b-ELISA is an alternative screening method for the detection of antibodies against the *N. caninum* in bovine population.

Acknowledgements

Funding for this study was provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Grant AUX-PE-PNPD-1513/2008) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of Interest

No competing financial interests exist.

References

1. Andreotti R, Matos MF, Goncalves KN et al (2009) Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. Rev.Bras.Parasitol.Vet. 18:19-22

- 200 2. Bacigalupe D, Basso W, Caspe SG et al (2013) *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces
 201 fetopathy in both serologically positive and negative experimentally inoculated pregnant
 202 dams. *Parasitol.Res.* 112:2585-2592
- 203 3. Baszler TV, Adams S, Vander-Schalie J et al (2001) Validation of a commercially available
 204 monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for
 205 detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J.Clin.Microbiol.* 39:3851-3857
- 206 4. Borsuk S, Andreotti R, Leite FP et al (2011) Development of an indirect ELISA-NcSRS2
 207 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Vet.Parasitol.* 177:33-38
- 208 5. Cobadiova A, Vichova B, Majlathova V et al (2013) First molecular detection of *Neospora*
 209 *caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). *Vet.Parasitol.* 197:346-349
- 210 6. de Oliveira UV, de Magalhaes VC, Almeida CP et al (2013) Quails are resistant to
 211 infection with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet.Parasitol.* 198:209-213
- 212 7. de Sa GL, de Borba PD, Monte LG et al (2013) Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43
 213 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*. *Curr.Microbiol.*
- 214 8. Dong J, Otsuki T, Kato T et al (2013) Development of two murine antibodies against
 215 *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of *N.*
 216 *caninum*. *PLoS.One.* 8
- 217 9. Dong J, Otsuki T, Kato T et al (2012) Development of a diagnostic method for neosporosis
 218 in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. *BMC.Biotechnol.* 12-19
- 219 10. Dubey JP (2003) Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean*
 220 *J.Parasitol.* 41:1-16
- 221 11. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS et al (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in
 222 dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*
 223 193:1259-1263

- 224 12. Dubey JP, Jenkins MC, Kwok OC et al (2013) Congenital transmission of *Neospora*
 225 *caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet.Parasitol.* 196:519-522
- 226 13. Dubey JP, Schares G (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet.Parasitol.* 140:1-34
- 227 14. Ghalmi F, China B, Jenkins M et al (2014) Comparison of different serological methods
 228 to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and canine sera.
 229 *J.Vet.Diagn.Invest.* 20:1-5
- 230 15. Hosseininejad M, Hosseini F, Mosharraf M et al (2010) Development of an indirect
 231 ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine
 232 *Neospora caninum* infection. *Vet.Parasitol.* 171:337-342
- 233 16. Langoni H, Greca H, Guimaraes FF et al (2011) Serological profile of *Toxoplasma gondii*
 234 and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from Sao Paulo State, Brazil.
 235 *Vet.Parasitol.* 177:50-54
- 236 17. Moraveji M, Hosseini A, Moghaddar N et al (2012) Development of latex agglutination
 237 test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in
 238 cattle. *Vet.Parasitol.* 189:211-217
- 239 18. Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA et al (1998) A modified agglutination test for
 240 *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-
 241 antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 5:467-473
- 242 19. Pare J, Hietala SK, Thurmond MC (1995) Interpretation of an indirect fluorescent
 243 antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* 7:273-275
- 244 20. Pinheiro AF, Borsuk S, Berne ME et al (2013) Expression of *Neospora caninum* NcSRS2
 245 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection.
 246 *Pathog.Glob.Health* 107:116-121
- 247 21. Reichel MP, Ayanegui-Alcerreca M, Gondim LF et al (2013) What is the global economic
 248 impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int.J.Parasitol.* 43:133-142

22. Takashima Y, Takasu M, Yanagimoto I et al (2013) Prevalence and Dynamics of Antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 Antigens of *Neospora caninum* in Cattle during the Gestation Period. J.Vet.Med.Sci. 75:1413-1418
23. Trees AJ, Guy F, Tennant BJ et al (1993) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. Vet.Rec. 132:125-126
24. Uzeda RS, Schares G, Ortega-Mora LM et al (2013) Combination of monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. Vet.Parasitol. 197:477-486
25. Ybanez RH, Terkawi MA, Kameyama K et al (2013) Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum* infection. Clin.Vaccine Immunol. 20:1617-1622
26. Yin J, Qu G, Cao L et al (2012) Characterization of *Neospora caninum* microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnostic marker for neosporosis. Vet.Parasitol. 187:28-35

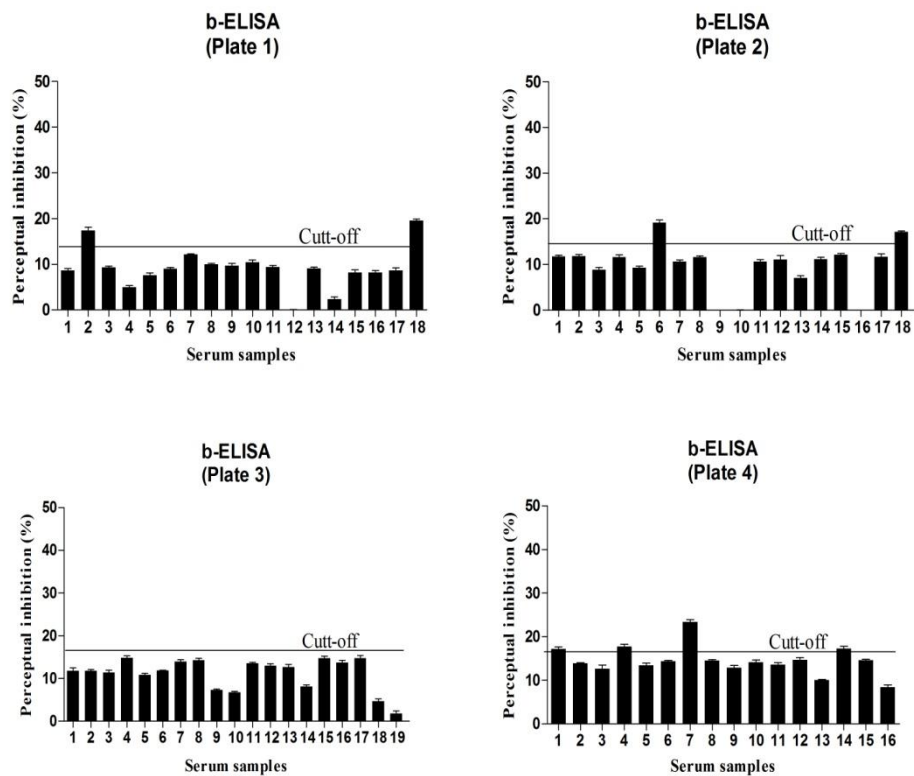


Figure 1. Blocking ELISA using rNcSRS2 and pAb/rNcSRS2 as diagnostic tools to detect *Neospora caninum* infection. Plate 1, 2, 3 and 4 represent the perceptual inhibition (PI) for each negative sample (71) using the following formula: $PI = 100 - [(OD \text{ of test sera} / OD \text{ of negative reference sera}) \times 100]$ [3]. The cut-off value was determined as the PI mean $\pm$ SD of negative control sera previously confirmed by IFAT.

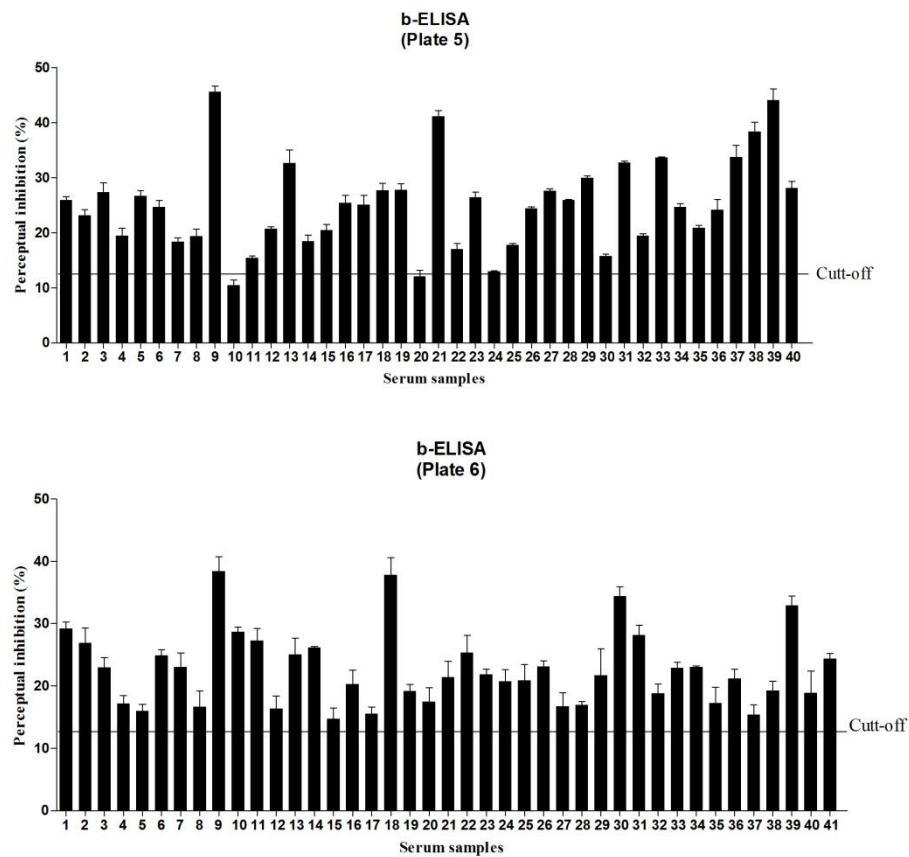


Figure 2. Blocking ELISA using rNcSRS2 and pAb/rNcSRS2 as diagnostic tools to detect *Neospora caninum* infection. Plate 5 and 6 represent the perceptual inhibition (PI) for each positive sample (81) using the following formula: $PI = 100 - [(OD \text{ of test sera} / OD \text{ of negative reference sera}) \times 100]$ [3]. The cut-off value was determined as the PI mean $\pm$ SD of negative control sera previously confirmed by IFAT.

Table 1. Anti rNcSRS2 antibody detection in bovine sera by b-ELISA compared to IFAT.

b-ELISA	IFAT		Total
	Positive	Negative	
Positive	80	8	88
Negative	1	63	64
Total	81	71	152

Sensitivity = 98,8 % (95% confidence interval between 92,4% and 99,9%); Specificity = 88,7 % (95 % confidence interval between 78,5 % and 94,7 %); Predictive Value Positive = 90,9% (95% confidence interval between 82,4% and 95,7%); Predictive Value Negative = 98,4% (95% confidence interval between 90,5% and 99,9%); Kappa = 0.8803

5 Conclusões gerais

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- O b-ELISA desenvolvido, como meio de diagnóstico da neosporose bovina, apresentou boa sensibilidade e especificidade e apresentou excelente concordância comparado ao teste sorológico padrão, segundo o teste Kappa.
- A utilização da rNcSRS2 e do anticorpo policlonal gerado contra esta proteína, são importantes ferramentas para o imunodiagnóstico da neosporose.
- Esse teste é de fácil processamento, além de poder ser utilizado no diagnóstico de amostras em larga escala, sendo uma alternativa de *screening* para detecção de anticorpos contra o *Neospora caninum*.

Referências

- ANDRADE, G. S.; BRUHN, F. R.; ROCHA, C. M.; DE SA, G. A.; GOUVEIA, A. M.; GUIMARAES, A. M. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 584-586, 2013.
- ANDREOTTI, R.; MATOS, M. F.; GONCALVES, K. N.; OSHIRO, L. M.; LIMA-JUNIOR, M. S.; PAIVA, F.; LEITE, F. L. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 19-22, 2009.
- ASMARE, K.; REGASSA, F.; ROBERTSON, L. J.; SKJERVE, E. Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 85-94, 2013.
- BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P.; PINTO, L. S.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F.; BERNE, M. E. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 33-38, 2011.
- BYREM, T. M.; BARTLETT, P. C.; DONOHUE, H.; VOISINET, B. D.; HOUSEMAN, J. T. Performance of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in whole and skim milk samples. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1-2, p. 249-253, 2012.
- CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, N. T.; OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M.; FAVA, C. D. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.
- CARDOSO, J. M.; AMAKU, M.; ARAUJO, A. J.; GENNARI, S. M. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 553-557, 2012.
- COBADIOVA, A.; VICHIOVA, B.; MAJLATHOVA, V.; REITEROVA, K. First molecular detection of *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 346-349, 2013.

DE SA, G. L.; DE BORBA, P. D.; MONTE, L. G.; SINNOTT, F. A.; XAVIER, M. A.; RIZZI, C.; BORSUK, S.; BERNE, M. E.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C. P. Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*. **Current Microbiology**, 2013.

DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; KOHSAKA, T.; IKE, K.; PARK, E. Y. Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of *N. caninum*. **PLoS One.**, v. 8, n. 1, p. e53264-2013.

DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; PARK, E. Y. Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 19-2012.

DUBEY, J. P. Neosporosis-the first decade of research. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1485-1488, 1999.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 452-458, 1993.

FROSSLING, J.; BONNETT, B.; LINDBERG, A.; BJORKMAN, C. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 3, p. 141-153, 2003.

GALGUT, B. I.; JANARDHAN, K. S.; GRONDIN, T. M.; HARKIN, K. R.; WIGHT-CARTER, M. T. Detection of *Neospora caninum* tachyzoites in cerebrospinal fluid of a dog following prednisone and cyclosporine therapy. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 3, p. 386-390, 2010.

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**, 2014.

GOFF, W. L.; MCELWAIN, T. F.; SUAREZ, C. E.; JOHNSON, W. C.; BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Rhoptry-Associated Protein 1 Epitope Specifically Identifies

Babesia bovis-Infected Cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 1, p. 38-43, 2003.

GONDIM, L. F.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A., JR.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **N.Z.Vet.J.**, v. 47, n. 1, p. 35-1999.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, n. 133-150, 2013.

HARTLEBEN, C. P.; LEAL, F. M. A.; MONTE, L. G.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; VASCONCELLOS, S. A.; BRIHUEGA, B.; DELLAGOSTIN, O. A. Serological Analysis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Antigen LipL32 for the Diagnosis of Swine Leptospirosis. **Current Microbiology**, 2012.

HIASA, J.; KOHARA, J.; NISHIMURA, M.; XUAN, X.; TOKIMITSU, H.; NISHIKAWA, Y. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 379-385, 2012.

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 Research**, v. 112, p. 2117-2120.

HOSSEININEJAD, M.; HOSSEINI, F.; MOSHARRAF, M.; SHAHBAZ, S.; MAHZOUNIEH, M.; SCHARES, G. Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen (P38) for sero-diagnosis of canine *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 337-342, 2010.

HU, J.; FERROGLIO, E.; TRISCIUOGLIO, A. Immunoblot diagnosis of infection with *Neospora caninum* in cattle based on recombinant NcSAG4 Antigen. **Parasitology Research**, 108, P.1055-1058, 2011.

JARDINE, J. E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 231-240, 1996.

JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G.; AGUADO-MARTINEZ, A.; SALMAN, H.; IRACHE, J. M.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-epsilon-caprolactone

against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 33, p. 4983-4992, 2012.

JIMENEZ-RUIZ, E.; BECH-SABAT, G.; ALVAREZ-GARCIA, G.; REGIDOR-CERRILLO, J.; HINOJAL-CAMPANA, L.; ORTEGA-MORA, L. M. Specific antibody responses against *Neospora caninum* recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice. **Parasitology**, v. 140, n. 5, p. 569-579, 2013.

MACHADO, G. P.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; PAES, A. C. Seroprevalence and risk factors associated with neosporosis in sheep and dogs from farms. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 356-358, 2011.

MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; AGUADO-MARTINEZ, A.; JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G. Transgenic *Neospora caninum* strains constitutively expressing the bradyzoite NcSAG4 protein proved to be safe and conferred significant levels of protection against vertical transmission when used as live vaccines in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 44, p. 7867-7874, 2011.

MORAVEJI, M.; HOSSEINI, A.; MOGHADDAR, N.; NAMAVARI, M. M.; ESKANDARI, M. H. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p. 211-217, 2012.

PEREIRA, G. R.; VOGEL, F. S. F.; BOHRER, R. C.; NÓBREGA, J. E.; ILHA, G. F.; ROSA, P. R. A.; GLANZNER, W. G.; CAMILLO, G.; BRAUNIG, P.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, P. B. D. *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers . **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 129-135, 2014.

PINHEIRO, A. F.; BORSUK, S.; BERNE, M. E.; PINTO, L. S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.; ROLLOF, B. C.; LEITE, F. P. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 3, p. 116-121, 2013.

SANTOLARIA, P.; ALMERIA, S.; MARTINEZ-BELLO, D.; NOGAREDA, C.; MEZO, M.; GONZALEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; PABON, M.; YANIZ, J. L.; LOPEZ-GATIUS, F. Different humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in purebred and crossbreed beef/dairy cattle pregnancies. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 70-76, 2011.

TAKASHIMA, Y.; TAKASU, M.; YANAGIMOTO, I.; HATTORI, N.; BATANOVA, T.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K. Prevalence and Dynamics of Antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 Antigens of *Neospora caninum* in Cattle during the Gestation Period. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 11, p. 1413-1418, 2013.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Prev.Vet.Med.**, v. 103, n. 2-3, p. 136-144, 2012.