

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DOMÍNIO
ANTIGÊNICO DA PROTEÍNA MAJORITÁRIA DE SUPERFÍCIE
NcSRS2 (Nc1-p43) RECOMBINANTE DE *Neospora caninum*.**

Cloning, expression and characterization of an antigenic domain of
the a major surface protein recombinant NcSRS2 (Nc1-p43) of
Neospora caninum.

Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DOMÍNIO
ANTIGÊNICO DA PROTEÍNA MAJORITÁRIA DE SUPERFÍCIE
NcSRS2 (Nc1-p43) RECOMBINANTE DE *Neospora caninum*.**

Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

Prof. Dr. Renato Andreotti e Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2006**

Aquele que conhece o outro é sábio.
Aquele que conhece a si mesmo é iluminado.
Aquele que vence o outro é forte.
Aquele que vence a si mesmo é poderoso.
Aquele que conhece a alegria é rico.
Aquele que conserva o seu caminho tem vontade.

Seja humilde, e permanecerás íntegro.
Curva-te, e permanecerás ereto.
Esvazia-te, e permanecerás repleto.
Gasta-te, e permanecerás novo.

O sábio não se exhibe, e por isso brilha.
Ele não se faz notar, e por isso é notado.
Ele não se elogia, e por isso tem mérito.
E, porque não está competindo, ninguém no mundo
pode competir com ele.

(Lao Tsé - Tao Te Ching)

DEDICATÓRIA

Ao meu amor Shirley,
*Ser profundamente amado por alguém nos dá força;
Amar alguém profundamente nos dá coragem.*

Lao-Tsé

Aos meus filhos, Ruth, Gabriel e Daniel,
Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos.

Lao Tzu

*In memoriam de meu avô Onofre da Costa Lima,
por ter me ensinado a ser sempre grato a vida.*

“Nos olhos do jovem arde a chama. Nos do velho brilha a luz.” (Victor Hugo)

AGRADECIMENTOS

À **VIDA**, o meu muito obrigado por tudo que me concedeu.

Ao meu orientador professor Dr. **Renato Andreotti e Silva** pela sua orientação valiosa, dedicação e confiança depositada .

Aos meus pais: **Maria Joana Souza Lima** e **Manoel Sebastião da Costa Lima**, pela oportunidade de estudar.

Aos meus sogros: **Maria de Lourdes Serra Washington** e **Rosental Washington**, por terem dado proteção, coragem, dedicação e ajuda imprescindível.

Aos meus tios: **Leila Neder da Costa Lima** e **Onofre da Costa Lima Filho**, pela amizade, prestatividade e apoio incondicional.

A meus eternos amigos de iniciação, **Mario Cantarino** e **Maria Cristina Cantarino** por colaborarem no meu desenvolvimento humano e espiritual.

A técnica de laboratório de biologia molecular da EMBRAPA – Gado de Corte **Jaqueline Cavalcante Barros**, pela colaboração e apoio nas atividades laboratoriais.

A médica veterinária **Leandra Marla Oshiro** pelo companheirismo e colaboração no trabalho.

A médica veterinária **Kelly Noda Gonçalves** pela amizade e ajuda da execução deste trabalho.

A pesquisadora cubana **Marisela Soares**, do Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Havana, pela amizade e pelo muito que ensinou em biologia molecular e biotecnologia.

A professora Dra. **Maria da Graça Moraes**, pelo esforço em manter e buscar a melhoria da qualidade do mestrado em Ciência Animal em nossa universidade.

A secretária do mestrado **Marilete Otaño Peixoto Ferencz** pela eficiência e prestatividade.

Aos amigos da **quarta turma de mestrado** em Ciência Animal da UFMS, pela união frente às dificuldades.

SUMÁRIO

“Página”

1. INTRODUÇÃO	03
1.1 Biologia do <i>Neospora caninum</i>	03
1.2 Hospedeiros definitivos	06
1.3 Hospedeiros intermediários	06
1.4 Mecanismo de transmissão de <i>Neospora caninum</i>	07
1.5 Neosporose	08
1.6 Resposta imune para <i>N. caninum</i>	09
1.7 Testes de diagnósticos	11
1.7.1 Diagnóstico direto	11
1.7.1.1 Exame Histopatológico	11
1.7.1.2 Exame imunohistoquímico	12
1.7.1.3 Detecção direta dos cistos de <i>Neospora caninum</i>	12
1.7.1.4 Exame de fezes	13
1.7.1.5 Isolamento <i>in vitro</i> de <i>N. caninum</i>	13
1.7.1.6 Isolamento <i>in vivo</i>	14
1.7.1.7 Reação da Polimerase em Cadeia – PCR	15
1.7.2 Métodos de Diagnóstico Sorológico	18
1.7.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta – IFI	19
1.7.2.2 Teste de imunoadsorção enzimática (ELISA)	20
1.8 Antígenos de <i>Neospora caninum</i>	21
1.8.1 Antígenos de superfície	22
1.8.2 Variações inter-específicas	24
1.8.2.1 <i>Neospora</i> e <i>Toxoplasma</i>	24
1.8.2.2 <i>N. caninum</i> e <i>Neospora hughesi</i>	25
1.8.3 Variações intra-específicas	25
1.8.3.1 Isolados de <i>N. caninum</i>	25
1.9 Antígenos específicos de acordo com o estágio do parasito	25

1.10	Localização e função das proteínas de <i>N. caninum</i>	26
1.10.1	Grânulos densos.....	26
1.10.2	Roptrias.....	27
1.10.3	Micronemas.....	27
1.10.4	Ciclofilinas.....	28
1.11	Proteínas relevantes para diagnóstico e vacina.....	28
1.12	Perspectivas.....	30
2.	REFERÊNCIAS	31
3.	ANEXO	50

1. Introdução

Neospora caninum é um protozoário apicomplexa que foi encontrado em cães na Noruega por Bjerkas et al. (1984). Estudos como de O'Toole e Jeffrey (1987) já traziam suspeitas, da associação de um novo gênero de protozoário com abortos em bovinos. Nesse trabalho, bovinos na Inglaterra foram diagnosticados para *Toxoplasma* e *Sarcocystis* por imunohistoquímica e os resultados foram negativos, mais tarde, confirmou-se como causa a presença do *N. caninum*.

Somente em 1988 Dubey e colaboradores descreveram-o como nova espécie pertencente ao phylum Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae.

Características semelhantes a outros organismos do *N. caninum* contribuíram para dificultar sua identificação. Lindsay et al. (1999a) demonstraram características similares nos oocistos de *N. caninum* com *Hammondia heydorni* em fezes de cães e *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi* em gatos. Ao microscópio óptico taquizoítas e bradizoítas são praticamente idênticos, mas pela microscopia eletrônica percebe-se roptrias em número, aparência e localização distintas nos diferentes protozoários (DUBEY et al., 1988a; LINDSAY et al., 1999a; SPEER et al., 1989).

A neosporose tornou-se recentemente uma patologia de relevância, devido aos prejuízos econômicos a bovinocultura no mundo por estar relacionado a falhas reprodutivas e diminuição da produtividade (DUBEY,1999c; TREES et al.,1999). O diagnóstico da neosporose no Brasil não é realizado rotineiramente em função da falta de informação sobre o parasito e do custo elevado do diagnóstico (ANDREOTTI et al., 2003).

A identificação e caracterização de antígenos do *N. caninum* fornece subsídios para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de elevada sensibilidade e especificidade, como também imunoproteção contra esse parasito (HEMPHILL et al., 1999).

1.1 Biologia do *Neospora caninum*

Esse protozoário é um parasito intracelular obrigatório com predileção ao sistema nervoso do hospedeiro. Na forma de taquizoítas se dividem rapidamente em tecidos infectados, ocorrendo em muitas células do corpo incluindo a derme, vísceras e sistema nervoso central (SNC), formando cistos nos tecidos em animais cronicamente infectados. Os cistos nos tecidos são encontrados principalmente no SNC, nervos periféricos e na retina, onde podem se romper e iniciar uma reativação nos animais

cronicamente infectados.

Várias espécies (bovinos, caninos, caprinos, ovinos, eqüinos e cervídeos) podem servir como hospedeiros intermediários. Ao se alimentar da carcaça do hospedeiro intermediário, o hospedeiro definitivo desenvolve uma infecção intestinal. O parasito sob reprodução sexuada se reproduz no intestino e, posteriormente, seus ovos (oocistos) são levados ao ambiente pelas fezes (DUBEY ; LINDSAY, 1996).

Os oocistos não esporulados, quando eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos não são infectivos, medem de 10 a 11 μ m de diâmetro e são esféricos ou subesféricos, contendo um esporonte central. Após três dias, esses oocistos esporulam e tornam-se infectivos no ambiente (MCALLISTER et al., 1998). Passam a apresentar dois esporocistos, que medem cerca de 8,4 x 6,1 μ m, e cada esporocistos contém quatro esporozoítas, medindo 7-8 x 2-3 μ m (LINDSAY et al., 1999a).

Após a ingestão dos oocistos pelo hospedeiro intermediário eles se desencistam e invadem os tecidos desenvolvendo uma infecção sistêmica. O parasito no cérebro apresenta, um comportamento de dormência nos tecidos principalmente na forma de bradizoítas, que são infecciosos em estado latente dentro dos cistos (DUBEY ; LINDSAY, 1996).

Os cistos teciduais possuem formas ovais com diâmetro de até 107 μ m e já foram observados em tecidos, como cérebro, medula espinhal, nervos e retina (DUBEY et al., 1988a). A maioria dos cistos teciduais apresentam parede variando de 1 a 2 μ m de espessura, podendo até medir 4 μ m, o que provavelmente está relacionado com o tempo de infecção. No interior desses cistos são encontrados os bradizoítas, que são delgados, medindo 6 a 8 x 1 a 1,8 μ m e apresentam as mesmas organelas da forma taquizoítas, exceto pela quantidade de roptrias que é menor nos bradizoítas (BJERKAS ; DUBEY, 1991).

Os taquizoítas (figura 1) podem ter formas ovóide, lunar ou globular e medir de 3 a 7 x 1 a 5 μ m, dependendo do estágio de divisão. Eles dividem-se em dois zoítas por endodiogenia (DUBEY ; LINDSAY, 1996). Sua penetração na célula hospedeira (células neurais, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, monócitos, hepatócitos e células epiteliais do tubo neural) ocorre por meio de invasão ativa, podendo começar após cinco minutos de contato com a célula (HEMPHILL ; GOTTSTEIN, 1996). Segundo Buxton et al. (2002) os taquizoítas podem multiplicar-se e destruir células se a resposta imune não for efetiva, se houver a resposta efetiva sobre o taquizoítas esses se diferenciam em bradizoítas originado um cisto tecidual persistente.

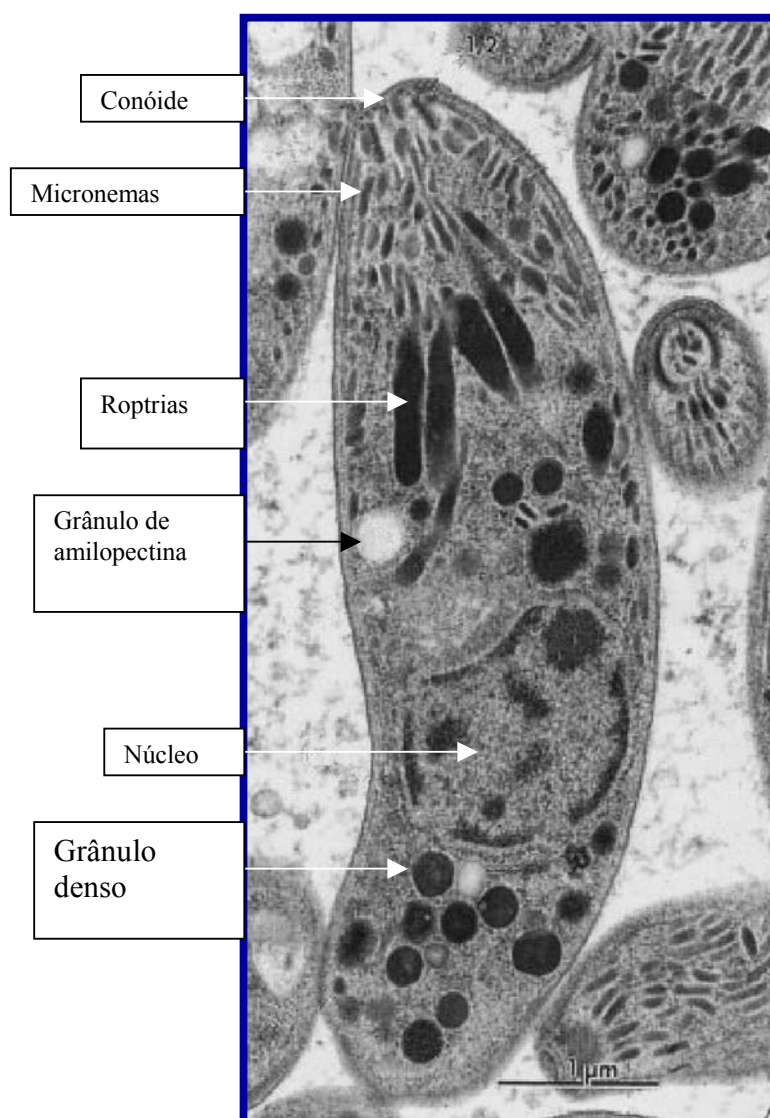


Fig. 1 Taquizoíta de *Neospora caninum* - Speer et al., 1999

À reativação dos cistos em situações de imunossupressão, como durante a gravidez, pode levar à reconversão de bradizoíta para taquizoíta e subsequente infecção da placenta e do próprio feto. Cistos com bradizoítas são oralmente infecciosos e estão intimamente ligados à transmissão vertical e horizontal da infecção (INNES et al., 2002; QUINN et al., 2002).

1.2 Hospedeiros definitivos

O cão é o hospedeiro definitivo do *N. caninum* e também intermediário, caso libere oocistos não esporulados nas fezes (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999b). Recentemente demonstraram que coiotes (*Canis latrans*) são também hospedeiros definitivos (GODIM et al., 2004).

Após o conhecimento do ciclo de vida completo do *N. caninum*, estudos epidemiológicos indicaram que a presença de cães em fazendas aumenta o risco de aborto por *Neospora caninum* no rebanho (PARÉ et al., 1998; WOUDA et al., 1999). Em 1998 cães infectados experimentalmente demonstraram que eles eliminam oocistos de *N. caninum* em suas fezes, confirmando que esse evento ocorre em condições naturais (MCALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999b, GODIM et al., 2002).

1.3 Hospedeiros intermediários

Estudos da soropositividade em animais como: bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, canídeos, além dos bubalinos e outros animais silvestres, dão indícios da participação no ciclo biológico do *N. caninum* como hospedeiros intermediários (DUBEY, 1999; DUBEY, 2003). No entanto, há necessidade da comprovação do papel como hospedeiro intermediário desses organismos.

No caso das raposas (*Vulpes vulpes*), ratos (*Rattus norvegicus*), guaxinim (*Procyon lotor*), bovinos, cervídeos, cães e ovinos eles são comprovadamente hospedeiros intermediários (ALMERIA et al., 2002; HUANG et al., 2004; LEMBERG et al., 2005; SCHARES et al., 2002; DUBEY et al., 2006, DUBEY, 2003)

Outro possível hospedeiro de interesse são os humanos, embora a semelhança entre a toxoplasmose e a neosporose não tenha sido observada. Soropositividade em fazendeiros, mulheres com histórico de aborto e outros grupos são indícios de infecção humana (NAM et al., 1998; PETERSEN et al., 1999; GRAHRAM et al., 1999; TRANAS et al., 1999; HEMPHILL ; GOTTSTEIN, 2000).

Moskwa et al. (2003), detectaram a presença de DNA de *N. caninum* em leite de bovinos infectados, aumentando assim a urgência de estudos em humanos. Estudos sorológicos em humanos não demonstraram títulos de anticorpos anti-*N. caninum* (GRAHRAM et al., 1999; PETERSON et al., 1999).

Cultura de *N. caninum in vitro* com soro humano adulto, negativo para *N. caninum* por

aglutinação, demonstrou a total ausência do efeito inibitório no desenvolvimento do *N. caninum*, ao contrário do que se observou com soro de ovinos que diminui significativamente o número de parasitos intracelular (OMATA et al., 2005).

Recentemente Lobato et al. (2006) detectaram alta soroprevalência para *Neospora caninum* (38 %) em humanos imunodeprimidos em função da infecção por vírus da AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida) e em pacientes com desordens neurológicas (18%) o que sugere ser uma zoonose oportunista, embora haja necessidade de testes detecção direta (PCR ou Imunohistoquímica) para confirmação dessa hipótese.

1.4 Mecanismo de transmissão de *Neospora caninum*

A principal via de transmissão em bovinos é a via transplacentária (via vertical ou infecção congênita) (PARÉ et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; SCHARES et al., 1998; DAVISON et al., 1999). Esse modo de transmissão possui uma eficiência de 81 a 95% (PARÉ et al., 1996; SCHARES et al., 1998; DAVISON et al., 1999).

A transmissão transplacentária pode ocorrer durante sucessivas gestações e fêmeas congenitamente infectadas podem mais tarde transmitir o parasita à progênie permitindo a persistência do parasita por muitos anos em um rebanho infectado sem que haja o envolvimento do hospedeiro definitivo (DAVISON et al., 1999a).

Anderson et al. (2000) observaram em rebanhos com neosporose endêmica evidência sorológica de infecção congênita e soropositividade similar entre os bezerros e os bovinos adultos. No entanto, durante um surto epidêmico resultados sorológicos demonstraram que as vacas que abortaram provavelmente adquiriram a infecção após o nascimento, devido a falta de associação entre a soropositividade de mães e filhas (THURMOND et al., 1997).

Bezerros infectados via oral com oocistos de cães infectados experimentalmente por *Neospora caninum* apresentaram infecção (DE MAREZ et al., 1999). Porém a transmissão experimental via placenta de infecção do feto com infecção via oocisto nos bovinos em gestação não foi descrita (ANDERSON et al., 2000).

A transmissão horizontal ocorre quando hospedeiros intermediários ou definitivos infectam-se consumindo os oocistos esporulados eliminados pelo hospedeiro definitivo (MCALLISTER, 1999).

As fontes de infecção para os cães ainda não foram identificadas, mas as placentas e os fetos de bovinos, e as carcaças de bezerros infectados via congênita podem conter cistos viáveis de *N. caninum*

e conseqüentemente, infectar os cães (MCALLISTER, 1999; DIJKSTRA et al., 2001 a).

O parasita infecta as placentas dos bovinos, que são consumidas freqüentemente por cães nas fazendas (SHIVAPRASED et al., 1989; FIORETTI et al., 2000; BERGERON et al., 2001). Os cães eliminaram oocistos de *N. caninum* após consumirem placentas de bovinos infectados naturalmente (DIJKSTRA et al., 2001).

Cães alimentados com tecidos de bezerros com neosporose eliminaram poucos oocistos não esporulados de *N. caninum* nas fezes. O período de eliminação foi de 16 dias e não se detectou anticorpos anti-*N. caninum* nesses cães, nos períodos de 11 e de 38 dias após a infecção experimental (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

A placentofagia em vacas implica em um forte indício de outra via de transmissão horizontal de neosporose entre bovinos (MODRY et al., 2001).

Outra forma de transmissão de *N. caninum* é chamada lactogênica que já foi demonstrada experimentalmente em bezerros recém-nascidos, alimentados com taquizoítas adicionados ao colostro, entretanto, não há evidências de que isto ocorra naturalmente (DAVISON et al., 2001). Cães alimentados com taquizoítas adicionados ao leite não eliminaram oocistos nas fezes (DIJKSTRA et al., 2001). Carnívoros podem adquirir a infecção por meio da ingestão de tecidos infectados (MACLLISTER et al., 1998).

1.5 Neosporose

A neosporose pode ocorrer ao longo do ano embora, algumas pesquisas indiquem que a incidência de neosporose é alta no inverno na Califórnia e mais alta no verão/outono na Holanda. Temperatura e umidade podem afetar o desenvolvimento, sobrevivência e transmissão dos oocistos, mas ainda faltam estudos para determinar se é sazonal a distribuição da neosporose (ANDERSON, et al., 1991). Embora sinais clínicos, além do aborto, tenham sido identificados em animais com mais de dois meses de idade, aborto tem sido o único sintoma observado em vacas. Sendo que, as quais, em qualquer idade podem abortar no período entre os três meses de gestação e até o final da gestação; entretanto, a maioria dos abortos induzidos por *Neospora* está relacionada com o período entre o 5º e 6º mês de gestação (BARR et al., 1998).

O feto pode morrer no útero e ser reabsorvido, mumificado, autolizado, natimorto, nascer vivo mas doente, ou nascer clinicamente normal mas cronicamente infectado. Abortos causados por *N.*

caninum podem acontecer anualmente e podem afetar somente uma parte das vacas, até 30% do rebanho. Vacas soropositivas para *N. caninum* são mais susceptíveis a aborto do que as vacas soronegativas (THURMOND ; HIETALA, 1996).

No nascimento, os bezerros contaminados no útero com *N. caninum* podem apresentar sintomatologia nervosa, estar abaixo da média do peso, com dificuldade de se desenvolver ou mesmo não apresentar sinais clínicos (WOUDA, et al., 1998). Membros anteriores ou posteriores podem estar flexionados ou hiperextendidos. Em exame neurológico frequentemente revelam ataxia, decréscimo no reflexo patelar e perda da percepção. Podem apresentar exoftalmia ou mesmo uma aparência assimétrica dos olhos (DUBEY, 1998)

A neosporose afeta tanto gado de corte como de leite e tem sido registrada na Europa, Escandinávia, África, Austrália, Estados Unidos, Brasil (DUBEY, 1999; GONDIM et al., 1999, SARTOR, 1997) e no Estado do Mato Grosso do Sul (ANDREOTTI, 2001).

Esta doença é considerada atualmente como a maior causa de aborto em gado de leite nos Estados Unidos, Nova Zelândia e na Holanda (THURMOND ; HIETALA, 1997b). Praticamente 100% de bovinos em alguns rebanhos vêm sendo expostos a *Neospora caninum* (DUBEY, 1999). Estima-se que 20 a 30% dos abortos na Califórnia estão relacionados com *N. caninum*, determinando um prejuízo de US\$35 milhões por ano (BARR, et al., 1998) .

1.6 Resposta imune para *N. caninum*

Experimentos em camundongos infectados com *N. caninum* demonstraram que sua resposta imune é parecida com a resposta de *Toxoplasma* (GAZZINELLI et al., 1993). A resistência para toxoplasmose demonstra-se associada a linfócitos T helper 1 (Th1) mediada por citocinas interferon- γ (IFN- γ), interleucina 12 e 2 (SUZUKI et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1994).

Estudos com infecção natural e experimental no gado sugerem similaridade com a resposta imune em camundongos, pois, a resposta Th1 é a principal resposta na proteção contra *Neospora caninum* (LUNDEN et al., 1998).

Em paralelo a resposta imune celular, a resposta humoral demonstra ter um papel na proteção contra *Neospora caninum*, já que camundongos soronegativos sucumbem a infecção por *N. caninum* (

EPERON et al., 1999). Altos níveis de IgG2a e baixos níveis de IgG1 são detectados durante a infecção em camundongos (INNES et al., 2002).

Camundongos deficientes de IL-12 (interleucina-12) ou IFN- γ foram incapaz de sobreviver a infecção com *N. caninum* (KHAN et al., 1997; BAZLER et al., 1999a; DUBEY et al., 1998). Em cultura *in vitro* de macrófagos de camundongos evidenciaram que a proliferação de *N. caninum* inibiu IFN- γ via geração de óxido nítrico (NO), como foi descrito anteriormente em *T. gondii* (TANAKA et al., 2000), sugerindo que a produção de NO, IFN- α - β - γ e TNF- α influencia na resistência em camundongos (INNES et al., 1995; NISHIKAWA et al., 2001d; YAMANE et al., 2000). Infecção de fibroblastos com *N. caninum* e tratamento com IFN- γ induz apoptose na célula hospedeira devido a associação da fragmentação do DNA e aumento da caspase 3 (NISHIKAWA et al., 2002). No entanto, a infecção aguda de *N. caninum* é letal em camundongos BALB/c deficientes em IFN- γ (NISHIKAWA et al., 2001c).

Geralmente os bovinos demonstram sinais clínicos durante a infecção pelo *N. caninum*, entretanto, problemas surgem durante a gravidez devido as mudanças no perfil de citocinas em função do estado de prenhez. Antes da gestação a fêmea é hábil em montar uma resposta efetiva Th 1 contra a infecção de *N. caninum*, enquanto durante o meio da gestação é predominante a combinação de resposta Th-2 e citocinas (INNES et al., 2002).

Dentre as citocinas a IL-10 abaixa taxa da produção de IFN- γ durante a infecção, o que estimula a recrudescência (reativação da infecção) e facilita a infecção do feto (INNES et al., 2002).

Diversos modelos com camundongos foram úteis nos estudos em respostas imunes à infecção do *N. caninum* (DUBEY ; LINDSAY, 1996; SAWADA et al., 1997). Células do baço de camundongos infectados produzem inicialmente IL-12 e depois interferon- γ (KHAN et al., 1997). Essas duas citocinas são importantes na resistência à infecção do *N. caninum* pois, camundongos tratados com anticorpos anti-IL-12 ou anti- IFN- γ sucumbem a uma infecção letal (KHAN et al., 1997; DUBEY et al., 1998; BASZLER et al., 1999a). Além disso, a classe complexo do histocompatibilidade principal (MHC) classe II regula macrófagos e células CD4+ a mediar o IFN- γ à infecção do *N. caninum* (NISHIKAWA et al., 2001a). A administração de IL-12 recombinante resulta em diminuição significativa de sinais clínicos adiantados, mas não parece alterar a proteção a longo prazo da doença, sugerindo que IFN- γ é um mediador principal da resistência durante a infecção aguda (BASZLER et al., 1999a). Em outros estudos, a suscetibilidade de camundongos está relacionada aos níveis IL-4, porque a resistência dos camundongos B10.D2 é associada com uma falta da produção de IL-4 por esplenócitos. Assim como também, a suscetibilidade de C57BL/6 e de ratos

BALB/c corresponde a um nível mais elevado do IL-4 de esplenócitos (LONG et al., 1998; BASZLER et al., 1999). A resposta inflamatória depois da infecção em camundongos está relacionado a ação da IL-6 e IFN- γ (SHIBAHARA et al., 1999).

Camundongos C57BL/6 deficientes de células-B foram sensíveis à infecção pelo *N. caninum* (EPERON et al., 1999), indicando que as células-B são também fatores importantes na resistência à infecção.

Os camundongos de BALB/c são susceptíveis a uma infecção na fase aguda e crônica da infecção do *N. caninum*, com taquizoítas disseminados nos tecidos, mas baixa mortalidade. Entretanto, camundongos BALB/c vacinados com o vírus recombinante que expressa a proteína NcSRS2 da superfície do *N. caninum*, foram protegidos e evitaram a progressão do parasito em diversos tecidos e órgãos (NISHIKAWA et al., 2001b). Assim, a vacinação de ratos BALB/c com o vírus recombinante demonstrou a imunidade protetora à infecção e à disseminação do *N. caninum*, já que os ratos não vacinados normais obtiveram somente a imunidade protetora parcial.

1.7 Testes de diagnósticos

1.7.1 Diagnóstico direto

Na pesquisa de *N. caninum* através de métodos diretos utiliza-se exames: histopatológico, imunohistoquímico, isolamento *in vitro* e *in vivo*, detecção do DNA do parasito por reação da polimerase em cadeia (PCR), a observação dos cistos à fresco e o exame de fezes (DUBEY et al., 1998; HEMPHILL et al., 2000; ANDERSON et al., 2000; SAGER et al., 2001; PETERS et al., 2001).

1.7.1.1 Exame histopatológico

O principal método de diagnóstico em fetos abortados está baseado no exame de tecidos fetais mediante o uso dos corantes - hematoxilina e eosina. A observação de lesões compatíveis a infecções por protozoários (encefalite não supurativa, miocardite, hepatites, placentites, etc.) (BARR et al, 1991, WOUDA et al., 1997), sugere o diagnóstico de aborto por neosporose. Essa técnica de referência necessita sempre de confirmação da presença do parasito já que outros protozoários poderiam causar lesões similares como espécies do gênero *Sarcocystis* (JENKINS et al., 2002). O outro aspecto a se levar em conta é o número reduzido de *N. caninum* viáveis, pois, estão geralmente em tecidos

autolizados, em fetos abortados, e estes freqüentemente não são visíveis em lâminas coradas com hematoxilina (AGERHOLM et al., 1997).

Freqüentemente observa-se o número pequeno de cistos no diagnóstico de neosporose em bovinos através do exame histopatológico, (LINDSAY et al., 1993; CAMPERO et al., 1998), principalmente em fetos (BERGERON et al., 2001) o que também diminui a capacidade de detecção direta dos cistos.

1.7.1.2 Exame imunohistoquímico

Peters et al. (2001) identificaram, pela primeira vez, cistos de *N. caninum* no músculo esquelético de cães e bezerros com infecção natural. Utilizando o método imunohistoquímico ele pôde diferenciar taquizoítas dos bradizoítas (LINDSAY; DUBEY, 1989).

O teste de imunohistoquímica dos tecidos fetais, que utiliza o feto inteiro, ou pelo menos o cérebro e a medula, é um eficiente método para confirmar o diagnóstico, contudo, sua eficiência é prejudicada por amostras de tecidos de abortos autolizados (ANDERSON et al., 1994).

A desvantagem do método imunohistoquímica é sua baixa sensibilidade já que a escassez de tecidos infectados dificulta a identificação, sendo necessário a coloração de vários cortes histológicos do sistema nervoso central (WOUDA et al., 1997; BOGER ; HATTEL, 2003).

Stenlund et al. (1997), Davison et al. (1997) e Sawada et al. (2000), não observaram lesões histológicas e parasitos pela imunohistoquímica, nas amostras de bovinos, porém, isolaram *N. caninum* em cultivo celular.

1.7.1.3 Detecção direta dos cistos de *Neospora caninum*

Esse método compreende utilização da microscopia direta, com amostras de cérebro suspeito são comprimidas em lâminas de vidro, com lamínula e examinadas sem coloração (DUBEY et al., 1998; GONDIM et al., 2001).

1.7.1.4 Exame de fezes

A pesquisa dos oocistos de *N. caninum* no exame de fezes é realizada por meio da flutuação, com uma solução de açúcar (MCALLISTER et al., 1998).

Basso et al. (2001a) realizaram o método da flutuação com solução de açúcar e encontram oocistos pequenos, semelhantes aos de *Hammondia heydorni*. Posteriormente, os oocistos foram confirmados como de *Neospora*, nos Estados Unidos, por PCR e inoculação em gerbils.

1.7.1.5 Isolamento *in vitro* de *N. caninum*

Inicialmente, os taquizoítas de *N. caninum* foram cultivados em monócitos bovinos e células endoteliais de artéria cardio-pulmonar bovina (LINDSAY ; DUBEY, 1989) e, posteriormente, se cultivou em diferentes linhagens celulares Vero e Marc-145 , células de rim bovino e fibroblastos de pele humana. Os taquizoítas podem manter-se indefinidamente mediante seu repasse contínuo em cultivo celular sem perdas aparentes da infectividade em camundongos e após conservação em nitrogênio líquido (DUBEY et al., 2002).

As principais amostras utilizadas para inóculo são cérebros e medula espinhal de bovinos, cães, camundongos e de eqüinos (MARSH et al., 1996; DUBEY et al., 1998; SAWADA et al., 2000). Nas amostras de fetos, o cultivo *in vitro*, os exames histopatológicos e os imunohistoquímicos são os métodos convencionais utilizados na detecção direta de *N. caninum* (SAGER et al., 2001).

Nos cultivos celulares, após 45-60 minutos finaliza-se a invasão celular e começa a endodigenia aparecendo a primeira geração de taquizoítas a dez horas após infecção (HEMPHILL et al., 1996; SUNDERMANN ; ESTRIDGE, 1999). Trinta e seis horas após infecção observou-se células infectadas com mais de dez taquizoítas inclusive um vacúolo parasitóforo bem desenvolvido. O número de taquizoítas se multiplica exponencialmente podendo se observar mais de cem em uma mesma célula em quatro dias pós-infecção. O efeito citopático na monocamada se observa aos três dias após infecção, ficando totalmente destruídas de quatro a cinco dias.

Além do maior tempo de isolamento, as cepas de *N. caninum* isoladas de bovinos apresentaram crescimento lento, durante e após o estabelecimento dos cultivos. As hipóteses sobre

as diferenças na virulência dos parasitas, ou adaptação ao cultivo celular precisam ser determinadas (CONRAD et al., 1993a; STENLUND et al., 1997).

O isolamento de *N. caninum* em camundongos ou cultivo celular é mais difícil do que o isolamento de *T. gondii* e o crescimento de *N. caninum* também é mais lento do que o de *T. gondii* em cultivo celular (DUBEY et al., 1998).

A taxa de proliferação parece variar entre as diferentes cepas de *Neospora*, sendo que alguns isolados multiplicam-se mais rapidamente do que os outros. A multiplicação das cepas isoladas de cães é mais rápida do que as de bovinos (CONRAD et al., 1993b; STENLUND et al., 1997). Provavelmente, a cepa de cão adapta-se mais facilmente ao crescimento em cultivo celular, mas a razão é desconhecida.

Somente a forma taquizoíta foi observada no cultivo *in vitro* de *N. caninum*, (LINDSAY ; DUBEY, 1989), mas Weiss et al. (1999) demonstraram a expressão de um antígeno específico de bradizoítos de *N. caninum*, em cultivos do parasita submetidos a condições de estresse.

1.7.1.6 Isolamento *in vivo*

O isolamento de *N. caninum* em relação ao *T. gondii* de tecidos suspeitos, mediante a inoculação em camundongos é mais difícil. O uso de determinadas espécies de camundongos pode facilitar o isolamento de *N. caninum* dos fetos bovinos, especialmente quando o material não é apto para o cultivo celular devido a contaminação microbiana. Os do tipo BALB/c são melhores do que os Swiss-Webster, principalmente quando o material não pode ser cultivado em células, em se tratando de contaminação microbiana (DUBEY ; LINDSAY, 1996).

Observou-se que a inoculação de cérebro de feto suspeito de infecção por *N. caninum*, em camundongos imunodeprimidos, e subsequente inoculação do cérebro do camundongo em cultivo celular, aumentaram as chances de obtenção do parasita (YAMANE et al., 1998). Sawada et al. (2000), utilizaram este método para isolar a cepa BT-3 de bovino.

Swiss Webster não é susceptível ao *Neospora caninum* mas, quando imunossuprimidos podem morrer e desenvolver cistos em condições não imunossupressoras esses camundongos permaneceram clinicamente normais, com anticorpos contra o parasita, e os cistos não foram observados Dubey et al. (1998).

Os gerbils imunocompetentes podem ser utilizados para o isolamento de *N. caninum*, a partir de amostras infectadas. No isolamento da cepa NC-Bahia, as amostras de cérebro de cão foram

inoculadas primeiro em gerbils imunocompetentes, que desenvolveram sinais clínicos, mas se recuperaram. Os cérebros dos gerbils, obtidos na eutanásia três a quatro meses depois, foram processados para inoculação em cultivo celular. Os taquizoítas apareceram entre sete e quinze dias após o inóculo nos frascos de cultivo (GONDIM et al., 2001).

1.7.1.7 Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

A detecção de DNA parasitário em tecidos suspeitos mediante PCR é a opção utilizada no diagnóstico em bovinos, devido as vantagens como : rapidez, tolerância a qualidade da amostra original, e facilidade de realização em laboratório de diagnóstico. Na prática a técnica de PCR tem sido utilizada principalmente no diagnóstico de aborto bovino, mas também em estudos de patogenia, epidemiologia e filogenia.

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma das técnicas mais importantes da biologia molecular, e representa um grande avanço no diagnóstico de várias doenças, pela amplificação de segmentos específicos do DNA. O método é utilizado para detectar o DNA de diversos patógenos, e durante os últimos anos vem se destacando como metodologia para pesquisa e diagnóstico de protozoários como *Toxoplasma* e *Neospora* (YAMANE et al., 1996; ELLIS, 1998; ELLIS et al., 1999; PITEL et al., 2001; SAGER et al., 2001).

A caracterização molecular de *N. caninum* objetivou a taxonomia e o desenvolvimento da PCR como método diagnóstico de neosporose (DUBEY ; LINDSAY, 1996). A maioria das pesquisas avançaram considerando que os isolados de *N. caninum* de cães e de bovinos, pertencem a mesma espécie e são geneticamente idênticos (MARSH et al., 1995).

A PCR, com a detecção do DNA de *N. caninum* em tecidos de fetos, bezerros, bovinos adultos e em placentas, pode ser um método diagnóstico, contudo, a técnica não é rotina devido ao seu custo e aos problemas técnicos associados com a detecção do DNA em cérebros de fetos autolisados (DUBEY, 1999; BERGERON et al., 2001). Outras desvantagens da PCR, além do custo relativamente elevado incluem a aquisição de equipamentos e experiência na realização das técnicas (ANDERSON et al., 2000).

Na França, Pitel et al. (2001) encontraram uma boa correlação entre os resultados positivos da PCR, em fetos bovinos, e a presença de anticorpos de *N. caninum* nas mães.

Neospora caninum poderia induzir o aborto sem invadir o feto, contudo, os exames por PCR, de placentas e os respectivos fetos abortados, demonstraram DNA de *N. caninum* somente nas placentas dos

fetos que também resultaram positivos (GOTTSTEIN et al., 1999). As prováveis alterações patofisiológicas pré-fetais causadas por neosporose ainda não foram elucidadas (SAGER et al., 2001).

O método da PCR pode ser aplicado para determinar a prevalência de *N. caninum* em cães domésticos e em canídeos selvagens, identificando-se os oocistos do parasita nas fezes (BASSO et al., 2001b).

Entre as técnicas descritas até o momento, cabe comentar aquelas baseadas na amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal (HOLMDAHL ; MATTSSON, 1996), as que amplificam fragmentos da região Nc5 de DNA genômico (YAMAGE et al., 1996) e as que utilizam o gene 14-3-3 de *N. caninum* (LALLY et al., 1996b).

As sequências de ITS1, ITS2 e 5.8S de *N. caninum* foram descritas por Payne ; Ellis,(1996) selecionando o segmento ITS1 para o desenvolvimento de provas de PCR específicas de *N. caninum*, já que essa região mostrava somente 80 % de similaridade com *T. gondii*. As sequências diferentes entre *N. caninum* e *T. gondii* foram utilizadas para o desenho de dois primers específicos de *N. caninum* correspondente a um fragmento de 279 pares de bases (pb), não amplificando este fragmento em *T. gondii* e nem em 4 espécies de *Sarcocystis*. Essa PCR foi suficientemente sensível para detectar 5 taquizoítas (HOLMDAHL ; MATTSSON, 1996).

Nos últimos anos, várias provas de PCR têm sido empregadas baseando-se em diferentes regiões, como por exemplo, uma Nested PCR que foi utilizada no estudo da patogenia em ovelhas (BUXTON et al., 1998) e em diagnóstico de aborto em bovinos (SCHOCK et al., 2001). Essa mesma PCR se aplicou para diagnosticar infecção pelo parasito em fetos bovinos na zona norte da Espanha obtendo-se 15,3 % de positivos (9/59) (PEREIRA-BUENO et al., 2003). A Nested PCR amplificou fragmento ITS1 com êxito e tem sido utilizada no diagnóstico de *N. caninum* e *T. gondii*, com DNA de cérebros em formol e em material parafinado. Os primers usados amplificam um fragmento de 147 pb, podendo até detectar 10 fg (fentogramas) de DNA genômico de *N. caninum* (ELLIS et al., 1999).

A PCR baseada na sequência Nc-5 descrita por Kaufmann et al. (1996), corresponde a uma sequência em particular que não se encontra em outro grupo taxonômico. A primeira PCR que se desenhou sobre essa região amplificava um fragmento de 944 pb de *N. caninum*, detectando até 100 pg (picogramas) de DNA do genoma do parasito. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade dessa PCR, Yamage et al. (1996) realizaram diversas combinações de primers. Entre as 19 utilizadas, os pares Np21/Np6, Np21/Np4 e Np7/Np6 mostraram ser específicos de *Neospora caninum*, detectando cerca de 10 pg de genoma do parasito e o par Np21/Np6 foi capaz de detectar apenas um taquizoíto em 2 mg de amostra de tecido cerebral de camundongo. Neste caso o fragmento resultante foi de 328pb. Para

otimizar o uso da PCR no diagnóstico de rotina, se introduziu o sistema UDG (Uracil DNA glicosidase) que elimina potenciais contaminações procedentes de fragmentos amplificados em reações prévias, e o DIA (DNA - imunoensaio de hibridização) que facilita a leitura dos resultados mediante a utilização de uma sonda fluorescente de captura específica de *Neospora* (MULLER et al., 2002).

Os primers Np21plus/Np6plus amplificaram um segmento de 337 pb e tem sido empregado na detecção do parasito em fetos bovinos abortados (GOTTSTEIN et al., 1998; PITEL et al., 2001; SAGER et al., 2001; SÖNDGEN et al., 2001).

A PCR seminested com os primers Np4/Np7 amplificou um fragmento de 275 pb da região Nc-5 de *N. caninum*, foi empregada sobre tecidos de 61 fetos bovinos abortados. O DNA foi obtido de tecido fresco ou congelado e fixados em formol e em parafina. Primeiramente os fetos foram analisados por histologia e imunohistoquímica agrupando-se em três grupos: positivos nas técnicas citadas, positivo para a primeira técnica, mas negativo para imunohistoquímica e negativo para ambas e verificou-se que a probabilidade de detectar ao parasito era maior na fixação química e nas zonas lesionadas. A PCR foi mais sensível comparada com a imunohistoquímica e se deveria empregar conjuntamente com histologia para confirmar o diagnóstico da infecção (BASZLER et al., 1999b). Posteriormente esta PCR Seminested foi utilizada em estudos de aborto bovino por neosporose na Coréia (KIM et al., 2002).

Yamage et al. (1996) fizeram uso de primers Np21/Np6 nos cérebros de camundongos infectados experimentalmente e posteriormente os primers Np21plus/Np6plus que foram usados para estudar a transmissão vertical de *N. caninum* em camundongos (LIDDELL et al., 1999b).

Uma PCR QC-PCR (quantitativo-competitiva) com os primers Np21/Np6 foi empregada para estudar os níveis de parasitos no cérebro e pulmões de filhotes de camundongos infectados experimentalmente com *N. caninum* (LIDDELL et al., 1999a) e uma PCR quantitativa em tempo real para estudar proliferação de *N. caninum* em cultivo celular (MÜLLER et al., 2002).

A PCR baseada no gene que codifica a proteína de eucariotas altamente conservada durante a evolução, amplificou por meio do PCR Nested um segmento estimado de 614 pb e detectou 5000 parasitos por grama de tecido cerebral (25 taquizoítos por cada grama 5 miligramas de tecido cerebral) (LALLY et al., 1996b). Contudo, essa PCR não foi aplicada nem em estudos de patogenia e nem estudos de diagnóstico de aborto bovino.

Finalmente, a PCR baseada no gene do RNA (ácido ribonucléico) ribossômico dos Apicomplexa utilizou primers COC-1 e COC-2 amplificando um produto de 294 pb. Para detectar *N.*

caninum e diferenciá-lo de outros apicomplexas, se desenhou uma sonda específica de *N. caninum* obtendo-se um padrão de detecção de um taquizoíta (HO et al., 1996, 1997a, b). Este sistema foi aplicado em estudos de patogenia e distribuição do parasito em infecções experimentais em vacas (HO et al., 1997b).

Apesar dos progressos da PCR na detecção de *Neospora*, existem poucas avaliações da sua aplicação no diagnóstico da infecção em bovinos, e atualmente a PCR ainda é utilizada em poucos laboratórios, como método diagnóstico e de pesquisa (ANDERSON et al., 2000). Existe uma tendência para que o método aumente de maneira significativa a detecção segura e a identificação espécie-específica do parasita ou do DNA do parasita, nas amostras de cérebro ou placenta. O emprego da PCR está aumentando nos laboratórios de diagnóstico da neosporose, e principalmente associada aos resultados histopatológicos (YAMAGE et al., 1996; SAGER et al., 2001).

1.7.2 Métodos de Diagnóstico Sorológico (Indiretos)

A infecção por *N. caninum* induz a produção de anticorpos ,entretanto, ainda não é possível determinar o início da infecção com base no exame sorológico (MCALLISTER et al., 2000). Por outro lado pesquisas com os testes sorológicos são importantes para os estudos da epidemiologia da infecção e da doença (ATKINSON et al., 2000).

Existem vários testes que detectam anticorpos séricos específicos para *N. caninum*, principalmente em cães e bovinos. Os mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA) (BJORKMAN et al., 1994; ANDERSON et al., 2000; ATKINSON et al., 2000). Os testes sorológicos de IFI e de ELISA necessitam do conjugado, o anticorpo secundário espécie-específico, para detectar os anticorpos de *N. caninum* (BJÖRKMAN ; UGGA., 1999; HEMPHILL ; GOTTSTEIN, 2000).

Os antígenos de *N. caninum* podem ser os naturais ou recombinantes, e diferem de acordo com o teste sorológico. No método da IFI, os taquizoítas inteiros são fixados nas lâminas, e nos diferentes tipos de ELISA, utiliza-se o extrato de taquizoítas; os taquizoítas inteiros; os antígenos de taquizoítas incorporados a um complexo imunoestimulante e os antígenos recombinantes (BJÖRKMAN ; UGGLA, 1999; HEMPHILL et al., 2000).

Os taquizoítas são obtidos de cultivo *in vitro*, de cepas de *N. caninum* isoladas de bovinos e de cães (ANDERSON et al., 2000), e não existem indicações que possíveis pequenas diferenças antigênicas entre os isolados afetem a eficácia dos testes (BJÖRKMAN et al., 1999).

Os principais antígenos imunodominantes dos taquizoítos são o p37 e p29/30, com 37 kDa e 29/30 kDa de massa molecular, respectivamente. Estão localizados nos grânulos densos e no vacúolo parasitóforo, e podem ser considerados como os alvos principais nos testes sorológicos (BJERKAS et al., 1994; ATKINSON et al., 2000) embora, nos soros com títulos baixos de anticorpos, alguns antígenos podem não ser detectados. Estes antígenos foram clonados, e as sequências de genes obtidas revelaram homologias aos genes que codificam os antígenos de superfície do *T. gondii* (SRS-2 e SAG-1).

1.7.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta - IFI

A técnica de IFI foi a primeira técnica sorológica aplicada a neosporose e tem sido muito utilizada como prova de referência. Utiliza-se como antígeno taquizoítas cultivados em meio livre de soro ou com soro equino. É específica e não se tem detectado reação cruzada com outros protozoários relacionados (DUBEY ; LINDSAY,1996). Contudo, tem uma série de inconveniências como o de possuir um certo grau de subjetividade na interpretação dos resultados e a necessidade de experiência prévia (BJÖRKMAN ; UGLA, 1999).

O método de IFI foi utilizado no diagnóstico da infecção em várias espécies animais, como: cães, raposas, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, equinos, roedores e primatas (DUBEY ; LINDSAY, 1996; BJÖRKMAN ; UGGLA, 1999).

A reação de imunofluorescência indireta é considerada como padrão ouro e um teste padrão para calibração e comparação com os novos testes (BJÖRKMAN et al., 1999; ATKINSON et al., 2000) e é usada para detectar, principalmente os anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular do parasito. Nas espécies do Phylum Apicomplexa, estes antígenos são considerados mais específicos do que os componentes intracelulares (PACKHAM et al., 1998).

Os pontos de corte empregados na IFI variam entre os diferentes laboratórios e ao comparar os resultados da IFI com os obtidos em outras provas diagnósticas (ELISA e imunohistoquímica, principalmente) se propõe diferentes títulos de soropositividade em função da espécie e da idade. Em relação a sorologia bovina, se emprega pontos de corte distintos em função da idade (fetos e vacas). Na sorologia fetal os pontos de corte mais aceitados variam de 1:50 (WOUDA et al., 1998a) até 1:80 (BARR et al., 1995), contudo González et al. (1999) sugerem o emprego de diferentes pontos de corte em função da idade gestacional do feto junto com conjugados anti-IgM para otimizar ao máximo o rendimento da técnica.

No gado bovino o empregado de pontos de corte tem oscilado entre 1:200 (SCHARES et al., 1998) e 1:640 (CONRAD et al., 1993b). Contudo, a sensibilidade da prova aumentou quando se empregou título de IFI de 1:50 para identificar os animais com infecção crônica (SCHARES et al., 1998).

Reação cruzada entre anticorpos de *N. caninum* e *T. gondii* não foi observada em soros de bovinos (DUBEY et al., 1996; GONDIM et al., 1999; OGAWA et al., 1999).

1.7.2.2 Teste de imunoadsorção enzimática (ELISA)

O teste de ELISA é o principal método sorológico utilizado nas avaliações dos rebanhos de bovinos, com finalidades diagnósticas ou nas pesquisas. O teste imunoenzimático apresenta algumas vantagens em relação ao método da IFI, pois sendo automatizado permite a realização de um maior número de análises, rapidez, e o registro das reações maneira objetiva (BJÖRKMAN ; UGGLA., 1999).

Já foram desenvolvidas inúmeras provas de ELISA para a detecção de anticorpos específicos frente a *N. caninum* que utilizam distintos antígenos. Os ELISAs convencionais empregam o antígeno solúvel de taquizoítas (PARÉ et al., 1995; BJÖRKMAN ; UGLA, 1999) com alguma variante como o ELISA de competição, no qual se utiliza um anticorpo monoclonal que compete com anticorpos específicos do soro problema, conferindo uma maior especificidade em relação ao ELISA indireto tradicional. Baszler et al. (1996) desenvolveram um ELISA de competição para detectar anticorpos específicos para *Neospora* em bovinos com anticorpos monoclonais (Mab 4A4-2) dirigido ao antígeno de superfície de 65 kDa. Também se utilizou taquizoítas fixados com formalina (WILLIAMS et al., 1997) ou antígenos incluídos em ISCOM (complexo imunoestimulante) (BJÖRKMAN et al., 1994).

As primeiras proteínas recombinantes utilizadas como antígenos no ELISA foram as proteínas de grânulos densos NcGRA6 e NcGRA7 (LALLY et al., 1996b; JENKINS et al., 1997).

Outros antígenos recombinantes utilizados são as proteínas de 20 e 29 kDa (N57 e N54, respectivamente) (LOUIE et al., 1997), Nc-p43 (AHN et al., 2003) e a forma recombinante dos antígenos de superfície SAG1 (HOWE et al., 2002) e SRS2 (NISHIKAWA et al., 2001c). Em outro ELISA é utilizado o antígeno imunodominante p-38 purificado por afinidade (SCHARES et al., 2000).

O título considerado como valor de "cut-off" para vacas adultas no teste de ELISA é desconhecido (VENTURINI et al., 1999). Os diferentes tipos de ELISA, incluindo o ELISA recombinante, apresentaram uma variabilidade nos resultados de amostras de bovinos, principalmente

nos soros com títulos baixos (DUBEY et al., 1997), ressaltando a importância do valor do "cut-off" para cada teste e cada aplicação. Nos soros com títulos elevados, geralmente de vacas que abortaram recentemente, todos os testes de imuno ensaio enzimático apresentaram bons resultados.

O valor do "cut-off" é determinado com soros de referência, caracterizados geralmente pela IFI. Nos diferentes tipos de ELISA (solúvel, "iscom", recombinante, e no IFI-ELISA), o valor da absorbância situado acima do valor do "cut-off" indica um resultado positivo (ATKINSON et al., 2000).

Nos últimos anos foram desenvolvidos diferentes ELISAs que permitem quantificar a avidéz das IgG anti- *N. caninum* presentes nos soros dos animais infectados e distinguir infecção recente e crônica. O primeiro ELISA de avidéz foi desenvolvido com partículas ISCOM (BJÖRKMAN et al., 1999) e posteriormente por Jenkins et al. (2000) e McAllister et al. (2000) para estudar a possível relação entre os abortos do rebanho e a infecção recente e ainda investigar se as vacas com antecedentes de infecção por *Neospora caninum* tinham uma maior probabilidade de apresentar aborto ou parir bezerros infectados congenitamente.

Recentemente, Schares et al. (2002) desenvolveram um ELISA de avidéz eficiente baseado no emprego da proteína purificada p-38, para diferenciar animais procedentes de rebanhos que apresentavam aborto epidêmico ou endêmico.

Sager et al. (2003) demonstraram mediante o emprego de um ELISA de avidéz que os baixos níveis de avidéz poderiam ajudar a predizer o aborto, embora não estejam necessariamente associados a infecções recentes.

O ELISA também foi aplicado na detecção de anticorpos para *N. caninum* em tanques de leite (BJÖRKMAN et al., 1997; HURKOVAI et al., 2005).

Os diferentes antígenos utilizados nos métodos da IFI, NAT (teste de aglutinação para *N. caninum*) e ELISA podem medir diferentes classes de anticorpos, resultando em uma variação nos resultados entre os testes (DUBEY et al., 1997; VENTURINI et al., 1999).

Frossling et al. (2002), desenvolvem um ELISA ISCOM como padrão ouro para o diagnóstico do *Neospora Caninum* com soros de bovinos da Suécia com um cut-off de 0.2, sensibilidade e especificidade de 96 a 99% respectivamente..

1.8 Antígenos de *Neospora caninum*

O estudo da composição antigênica de *N. caninum* é um dos aspectos que despertou interesse na

comunidade científica desde o primeiro isolamento em cultivo celular. Sua manutenção *in vitro* permitiu purificar um número elevado de taquizoítas para obtenção e análise de suas proteínas.

Howe ; Sibley (1999) estabeleceram uma nomenclatura comum para denominar as proteínas de *N. caninum*, para facilitar as comparações entre as diferentes espécies da subfamília. De acordo com essa proposta, as proteínas localizadas em micronemas são denominadas com as seguintes siglas: MIC ou MAP (proteínas associadas a micronemas) ; aos grânulos densos de GRA; as proteínas das roptrias de ROP e aos antígenos de superfície de SAG (gene do antígeno de superfície) e SRS (seqüências relatadas da superfície). Com a descoberta de novas proteínas se adicionou, por exemplo as proteínas de micronemas de *T. gondii* se denominam TgMIC1, TgMIC2 e assim sucessivamente. No caso de *N. caninum*, as proteínas homólogas que se tem caracterizado se denominam o prefixo 'Nc'.

Diversos antígenos foram identificados em taquizoítas de *N. caninum* usando-se diferentes técnicas tais como: levantamento de anticorpos monoclonais, produção de soro policlonal contra o parasito inteiro, construção de bibliotecas de cDNA, fração subcelular do parasito e purificação de anticorpos de afinidade. A maioria dos antígenos foram encontrados na superfície do parasita, organelas secretadoras, micronemas, roptrias e grânulos densos. Os antígenos detectados incluem os de superfície: NcSAG1(Nc-p36) e NcSRS2 (Nc-p43), dos grânulos densos: NcGRA1 , NcGRA2, NcGRA6, NcGRA7, dos micronemas: NcMIC1-4 e NcMIC10, a serino protease: Nc-p65 e finalmente uma hidrolase de nucleoside-3-phosphate (HEMPHILL et al., 1999).

Schares et al. (1999b) mostraram pela inspeção do tecido do cérebro do cão com cistos de *N. caninum* outro antígeno de superfície de 38 kDa , idêntico a NcSRS2, presente nos taquizoítas e não nos bradizoítas. No entanto, Fuchs et al. (1998) relataram a expressão de NcSRS2 nos cistos em camundongos .

1.8.1 Antígenos de superfície

Segundo Hemphill et al. (1996), proteínas da superfície celular são importantes para a sobrevivência do parasito, pois estão envolvidas com a adesão, invasão e estímulo a resposta imune do hospedeiro. Björkman et al. (1994) identificaram as primeiras proteínas de 17-18 e 30-45 kDa da superfície de *N. caninum* por Western Blot. Posteriormente, estes antígenos foram estudados mais especificamente com seis anticorpos monoclonais (BJÖRKMAN; HEMPHILL, 1998), caracterizando

os antígenos imunodominantes de 18, 30, 32 e 41 kDa. Schares et al. (1999b) identificaram três antígenos de superfície de 19, 28 e 40 kDa que pareciam coincidir com os anteriormente descritos.

Existem dois antígenos majoritários de superfície que possuem aproximadamente 29 kDa e 35 kDa pelas condições nativas em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio) e tem sido referidas como p29 e p35 respectivamente (HOWE et al., 1998). Estes antígenos também foram chamados de Nc-p36 e Nc-p43 devido a alteração na migração em SDS-PAGE quando se usou o agente redutor β -mercaptoetanol (HEMPHILL et al., 1996; HEMPHILL et al., 1997a) que quebra as pontes de dissulfeto das proteínas e diminui sua migração no gel da eletroforese causando um aumento aparente no peso molecular. Em condições não desnaturante (sem β -mercaptoetanol) a SRS2 possui 35 kDa e a SAG1 29 kDa. Pela contagem de aminoácidos, as duas possuem respectivamente, 34.1 kDa e 28.2 kDa (HOWE et al., 1999).

Essas duas proteínas p29 e p35 são altamente imunogênicas e são reconhecidas por soro de animais infectados por *Neospora* (HOWE et al., 1998).

Hemphill et al. (1997a) caracterizaram a glicoproteína SAG1 de 36 kDa localizada tanto na superfície do parasito como no interior dos grânulos densos, e Howe et al., (1998) clonaram uma proteína idêntica a NcSAG1 de 29 kDa, cujo homólogo em *T. gondii* é a proteína TgSAG1 de 30 kDa.

Da mesma forma como ocorre com antígenos de outros parasitos protozoários, p29 e p35 estão ligados a superfície da membrana via ancora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (HOWE et al., 1998) e ao se comparar p29 (Nc-p36) e p35 (Nc-p43) com antígenos de superfície do *T. gondii* constatou-se homologia com a família de antígenos SAG e SRS , exatamente com a SAG1 (BURG et al.,1988) e SRS2 (MANGER *et al* . 1998) respectivamente (HOWE et al., 1998). Assim Howe et al. (1999) recomenda que a p29 seja denominada de SAG1 e a p35 de SRS2.

A primeira proteína de superfície de *N. caninum* clonada foi a proteína NcSRS2 de 43 kDa (HEMPHILL et al., 1996; HEMPHILL ; GOTTSTEIN, 1996; HEMPHILL et al., 1997b), cujos epítomos são majoritariamente de natureza proteica. Esta proteína apresenta homologia com proteínas SRS de *T. gondii* e, devido a ausência de reações cruzadas com *T. gondii*, poderia ser utilizada para o imunodiagnóstico (HEMPHILL et al., 1996).

1.8.1 Variações inter-específicas

1.8.1.1 *Neospora* e *Toxoplasma*

O padrão antigênico de *Neospora* varia consideravelmente em relação ao *Toxoplasma* em Western Blot (BJERKAS et al., 1994). Contudo, observa-se reações cruzadas entre antígenos 46, 88 e 97 kDa de *Neospora* com antígenos de *Toxoplasma* 45, 66 e 85 kDa sob condições redutoras e não redutoras, também foi detectado um antígeno de taquizoíto de 107 kDa de *T. gondii* com anticorpo monoclonal de camundongo 6G7, desenvolvido frente a taquizoítas de *N. caninum* e com o uso de microscopia eletrônica, estas reações foram observadas com antígenos de micronemas e roptrias de *T. gondii* (COLE et al., 1994). Posteriormente, Fuchs et al. (1998) descobriram reações cruzadas com antígenos de 40, 43 e 48 kDa de *T. gondii*, os quais foram detectados por soro policlonal anti-neospora. Todas essas evidências sugerem a existência de epítomos comuns entre ambas espécies apesar disso não ser frequente.

Neste sentido estudos realizados com a proteína NcGRA7 por Hemphill et al. (1998), tanto com anticorpos policlonais anti-*N. caninum* quanto com anticorpo purificados por afinidade frente a esse antígeno, não se encontrou reconhecimento por imunofluorescência ou Western Blot do taquizoíto de *T. gondii*. Duas proteínas de superfície dos taquizoítas de *N. caninum*, Nc-p43 (NcSRS2) e Nc-p36 (NcSAG1), também não apresentaram reações cruzadas com soro anti-*Toxoplasma* (HEMPHILL et al. 1997a; 1997b), confirmando a existência de diferenças entre *N. caninum* e *T. gondii* em relação a expressão de moléculas intracelulares e de superfície (HEMPHILL et al., 1998; HOWE ; SIBLEY, 1999).

Tanto no *N. caninum* como no *T. gondii*, os taquizoítas e os bradizoítas podem diferenciar-se pela expressão específica de seus antígenos. Foi mostrado por Kasper et al. (1989) que os antígenos principais TgSAG1 e TgSAG2 da superfície do *T. gondii* eram expressos especificamente no estágio taquizoítas. Similarmente, ao *N. caninum* SAG1 homóloga a NcSAG1 demonstrou diminuída sua expressão durante a conversão do estágio taquizoíta para bradizoíta. (FUCHS et al., 1998; VONLAUFEN et al., 2004).

A média da sequência idêntica de aminoácidos entre os membros da família de proteínas SAG e SRS é de aproximadamente 25 %, sugerindo que os respectivos genes aumentaram por eventos de duplicação. A sequência conservada observada entre NcSAG1 e TgSAG1 ou entre NcSRS2 e TgSRS2

é 53 % e 44% respectivamente. (HOWE et al., 1998). Essas taxas indicam que a família SAG/SRS de antígenos de superfície originaram-se de um ancestral comum (HOWE ; SIBLEY, 1999).

1.8.1.2 *N. caninum* e *Neospora hughesi*

Entre as duas espécies poucos trabalhos detectaram diferenças ultraestruturais, antigênicas e na sequência genética (MARSH et al., 1998; WALSH et al., 2001). Walsh et al. (2001) compararam a expressão de duas proteínas imunodominantes do gênero *Neospora* -SAG1 e SRS2- e em ambas espécies a diferença foi de 6 e 9 % na identidade aminoacídica, respectivamente. Além de se detectar diferenças nos epítomos conformacionais destas quando se analisou o reconhecimento dos anticorpos desenvolvidos frente a tais proteínas.

1.8.2 Variações intra-específicas

1.8.2.1 Isolados de *N. caninum*

Atkinson et al. (1999) analisaram os soros de camundongos experimentalmente com dois isolados infectados, um de origem canina NC-LIV e outro de origem bovina NC- SwebB1, onde evidenciou-se o reconhecimento do taquizoíto de *N. caninum* por Western Blot. A única diferença encontrada foi uma maior intensidade de reconhecimento da uma banda de 50 kDa pelos soros provenientes de camundongos infectados com Nc-Liv. Estes estudos coincidem com os realizados por Barber et al. (1995), Paré et al. (1995) e Schok et al. (2001), sendo que nos quais observaram um perfil antigênico idêntico em todos os isolados analisados quando utilizou-se o soro de bovinos infectados como no soro policlonal de coelho imunizado.

1.9 Antígenos específicos de acordo com o estágio do parasito

Identificou-se antígenos específicos compartilhados tanto na forma taquizoíta como na bradizoíta. Em estudo realizado por Fuchs et al. (1998) analisou-se três antígenos: NcGRA7 e NcSAG1 e NcSRS2. Enquanto o gene da NcSAG1 expressava-se apenas em taquizoítas a NcGRA7 e NcSRS2 estavam presentes nas duas formas do protozoários .

Schares et al. (1999b) identificaram uma proteína exclusiva da forma taquizoíta p38 e outra de 61 kDa através de anticorpos monoclonais. Recentemente, Sonda et al. (2000) e Keller et al. (2002) identificaram proteínas do micronema NcMIC3 e NcMIC1, que estavam nos dois estágios do parasito.

A dificuldade de se obter cistos, tanto *in vitro* como *in vivo*, com bradizoítas atrapalha a identificação de antígenos específicos desse estágio.

1.10 Localização e função das proteínas de *N. caninum*

A identificação, caracterização e localização dos antígenos do parasito podem ajudar a determinar o possível papel destes mecanismos de adesão, invasão e multiplicação de *N. caninum*.

Ao contrário de outros patógenos intracelulares, os quais penetram na célula hospedeira mediante fenômenos de fagocitose ou endocitose, os parasitos Apicomplexa, realizam invasão da célula mediante um processo ativo no qual intervêm complexos processos de motilidade, adesão a moléculas de superfície e penetração na célula hospedeira.

Para executar os complexos processos de adesão e invasão celular, os Apicomplexas contam com um grande número de proteínas específicas.

A característica mais importante das formas invasivas deste grupo é o chamado complexo apical localizado na porção extrema anterior do parasito (BLACKMAN ; BANNISTER, 2001). Na maioria dos parasitos do phylum Apicomplexa o complexo apical participa no reconhecimento e na penetração da célula hospedeira (HEMPHILL et al., 1999). Antes, durante e após a invasão celular moléculas específicas são secretadas por organelas secretadoras – grânulos densos, roptrias e micronemas, a maioria dos quais se localizam na parte do complexo apical.

Já que o *N. caninum* e *T. gondii* são protozoários estreitamente relacionados, nas moléculas de superfície e nas organelas secretadoras desses parasitos descrita até o momento se evidencia o alto grau de homologia entre ambos (HEMPHILL et al., 1999; HOWE ; SIBLEY 1999).

1.10.1 Grânulos densos

Os grânulos densos são organelas secretoras, que se localizam no extremo anterior e posterior do parasito. As moléculas que secretam os grânulos densos se dirigem até superfície do parasito, facilitando a interação do taquizoíta com a célula hospedeira e sua posterior invasão. São secretadas dentro do vacúolo parasitóforo durante e depois da penetração na célula hospedeira formando parte do

interior e da membrana do vacúolo parasitóforo. A secreção destas proteínas ocorre durante a multiplicação intracelular do parasito.

No *N. caninum* pouco se conhece sobre os componentes das diferentes organelas secretoras. As primeiras proteínas de grânulos densos foram identificadas mediante a técnica de Western Blot com soros procedentes de diversas espécies com infecção natural e experimental (BJERKAS et al., 1994). Nesse estudo, se identificaram duas proteínas imunodominantes de 29 e 30 kDa reconhecidas por soros de diferentes espécies associadas aos grânulos densos e a membrana da vacúolo parasitóforo.

Lally et al. (1996a) clonaram duas proteínas de grânulos densos do taquizoíta de *Neospora* - NcGRA6, NcGRA7 de 37 e 33 kDa, respectivamente e demonstraram sua utilidade diagnóstica ao desenvolver-se um ELISA. Posteriormente, Hemphill et al. (1998) comprovaram que esta proteína é secretada na membrana do vacúolo parasitóforo, aparecendo mais tarde associada a matriz do vacúolo.

As proteínas NcGRA6 e NcGRA7, outras proteínas dos grânulos densos de 29 e 67 kDa, denominadas NcNTPase-I (ASAI et al., 1998) e NcGRA2 (ELLIS et al., 2000) respectivamente, foram identificadas e caracterizadas. A proteína NcGRA2 apresenta uma identidade de 50% com sua homóloga em *T. gondii* - TgGRA2, enquanto que a proteína Nc-NTPase-I apresentou reações cruzadas e uma identidade de 69% com as proteínas de *T. gondii* NTPase-I e NTPase-II.

1.10.2 Roptrias

As roptrias são organelas que estão relacionadas com a invasão da célula hospedeira e estabelecimento rápido da infecção (BJERKAS et al., 1994; DUBREMETZ, 1998) e algumas delas formam parte do vacúolo parasitóforo. Somente identificou-se uma proteína de roptrias de 17 kDa de *Neospora* que até o momento não foi clonada, mas considerada imunodominante (BARTA et al., 1992).

1.10.3 Micronemas

Os micronemas possuem funções relacionadas com invasão e adesão celular. Para ter essas funções o conteúdo dos micronemas são secretados na zona apical dos zoítos, possivelmente no momento do contato inicial com a célula hospedeira. Uma vez na superfície do parasito, as proteínas dos micronemas participam na interação com as moléculas da célula hospedeira estabelecendo uma forte união entre o parasito e a célula para assim iniciar a invasão ativa. Enquanto no *T. gondii* foi identificado 9 proteínas de micronemas (RABENAU et al., 2001), em *N. caninum* apenas três foram

caracterizadas, NcMIC3 (SONDA et al., 2000) , NcMIC2 (LOVETT et al., 2000) e , NcMIC1 (KELLER et al., 2002) de 38, 95 e 60 kDa respectivamente.

NcMIC3 foi identificada como um dos antígenos imunodominantes de *N. caninum* (SONDA et al., 2000). De acordo com os resultados obtidos por Naguleswaran et al. (2001), a proteína NcMIC3 se localiza exclusivamente nos micronemas dos taquizoítas intracelulares. Os estudos de imunolocalização apontam uma localização variável desta proteína dentro do parasito e influência na fase de invasão em que se encontre.

À proteína NcMIC2 também se atribui um papel na adesão e invasão celular. Recentemente, incluiu-se no banco de gene duas sequências de *Neospora* denominadas NcMIC10 e NcMIC11, que poderiam codificar duas proteínas de micronemas, já que suas sequências apresentam homologia elevada com sequências que codificam proteínas de *T. gondii* TgMIC10 e TgMIC11 respectivamente. Finalmente, a única enzima clonada de *Neospora* é uma serino-protease de 65 kDa (LOUIE ; CONRAD, 1999; LOUIE et al., 2002) localizada nos micronemas do taquizoítas e denominada NcSUB1, a qual apresenta elevada identidade aminoácida com a proteína de *T. gondii* denominada TgSUB1.

A proteína NcMIC4 é a segunda proteína de micronema, depois da NcMIC3 já descrita, que exibe afinidade por glicosaminoglicanos sulfato condroitino. Ela é secretada no meio de cultura , na forma solúvel, quando se incuba taquizoítas extracelulares de *N. caninum* a 37° C (KELLER et al., 2004).

1.10.4 Ciclofilinas

São proteínas citosólicas descritas em organismos procariotos e eucariotos (HAMILTON et al., 1998). São secretadas no meio de cultura de taquizoítas ou apresentam-se abundantemente em lisados de taquizoítas de *N. caninum*. Sua capacidade de induzir a produção de IFN- γ pelas células mononucleadas do sangue periférico e células T CD4⁺ sugere um importante papel imunoprotetor (TUO et al., 2005).

1.11 Proteínas relevantes para diagnóstico e vacina

Já foi descrito uma série de antígenos imunodominantes de *Neospora caninum* cujos pesos moleculares diferem entre diferentes estudos. Pelo menos 20 antígenos foram relatados pela primeira

vez por Barta et al. (1992). Esses antígenos possuem peso molecular entre 16 e 80 kDa e a maioria se localiza e organelas de taquizoítas e foram reconhecidos por soro policlonal de coelho. Por outro lado soros procedentes de diferentes espécies com infecções naturais e experimentais, incluindo bovinos e cães reconheceram quatro antígenos imunodominantes - 17, 29, 30 e 37 kDa - e vários antígenos menores de *N. caninum* (BJERKAS et al., 1994).

Outros autores, obtiveram resultados similares em relação ao padrão de reconhecimento Western Blot por soros de vacas com infecção natural (PARÉ et al., 1995; STENLUND et al., 1997; SCHARES et al., 1999a; ATKINSON et al., 2000) mas não tiveram concordância com Baszler et al. (1996) e Harkins et al. (1998). No estudo realizado por Baszler et al. (1996) os soros de vacas e os fluídos fetais detectaram majoritariamente três antígenos cujos pesos moleculares foram de 25, 65 e 116 kDa, enquanto que no estudo de Harkins et al. (1998) os soros de vacas com infecção natural e soros procedentes de ovelhas e cabras com infecção experimental apresentaram um padrão de reconhecimento antigênico diferentes.

Em relação ao emprego de antígenos específicos de *N. caninum* para a produção de vacinas estudos valorizaram as vacinas de subunidades e se avaliou a eficiência das proteínas NcSRS2 e SAG1 em camundongos para prevenir a infecção (NISHIKAWA et al., 2000) e a transmissão vertical (NISHIKAWA et al., 2001c). Tanto com o emprego do vetor de expressão, quanto com a vacina de vírus obtiveram-se resultados positivos. Enquanto a proteína SRS2 conferiu uma proteção eficaz frente a infecção e a transmissão vertical em camundongos fêmeas gestantes ao estimular uma resposta imune do tipo Th1. A proteção obtida com a proteína SAG1 foi parcial detectando-se uma produção tardia de IgG. Além disso, quando se utilizou a SRS2 para imunizar cães, se conseguiu estimular a produção de anticorpos específicos (NISHIKAWA et al., 2000).

Utilizando-se vacina de vírus para clonar os antígenos NcSRS2 e NcSAG1 observou prevenção na transmissão vertical (NISHIKAWA et al., 2001c). Trabalhos utilizando a Nc SRS2 (HALDORSON et al., 2005a; HALDORSON et al., 2005b; CHO et al., 2005) demonstram sua eficiência no controle da infecção e da transmissão vertical.

Cannas et al. (2003b) vacinaram camundongos com as proteínas recombinantes NcSAG1 ou NcSRS2 e a combinação das duas com vacina de DNA de ambas as proteínas. O resultado mais satisfatório se observou com a vacina de DNA de NcSAG1 e resultado similar ocorreu com a proteína recombinante NcSAG1.

A vacinação com a proteína NcMIC3 em modelo murino também mostrou ser eficaz em relação ao estabelecimento da infecção no sistema nervoso central (CANNAS et al., 2003a).

1.12 Perspectivas

A caracterização e a expressão da NcSRS2 (Nc1-p43) no laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA gado de corte fornece subsídios para adaptação de tecnologia de DNA recombinante e desenvolvimento de um teste de diagnóstico Sorológico (ELISA recombinante) para *Neospora caninum* em bovinos, canídeos, ovinos e caprinos.

2. REFERÊNCIAS

- AGERHOLM, J. S.; WILLADSEN, C. M.; NIELSEN, T. K.; GIESE, S. B.; HOLM, E., JENSEN, L., AND AGGER, J. F. Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *Zentralbl. Veterinarmed*, v. 44, n. 9-10, p. 551-558, 1997.
- AHN, H. J.; KIM, S.; KIM, D.Y.; NAM, H.W. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 41, n. 3, p. 175-177, 2003.
- ALMERIA, S.; FERRER, D.; PABON, M.; CASTELLA, J.; MANAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 107, n. 4, p. 287-294, 2002.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 60, n. 60-61, p. 417-431, 2000.
- ANDERSON, M. L.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, v. 10, n. 3, p. 439-461, 1994.
- ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 198, n. 2, p. 241-244, 1991.
- ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 122, p. 65 - 67, 2001.
- ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T. ; PAIVA, F. Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos. Campo Grande.; Embrapa Gado de Corte, p.51 (Documentos/Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747; 136), 2003.
- ASAI, T.; HOWE, D. K.; NAKAJIMA, K.; NOZAKI, T.; TAKEUCHI, T.; SIBLEY, L. D. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Experimental Parasitology*. v. 90, n. 3, p. 277-285, 1998.
- ATKINSON, R., HARPER, P. A., RYCE, C., MORRISON, D. A., ELLIS, J. T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 4, n. 118, p. 363-370, 1999.

ATKINSON, R.; HARPER, P.A.W.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of caule. *Parasitology Today*, v. 16, n. 3, p. 110-113, 2000.

BARBER, J. S.; HOLMDAHL, O. J.; OWEN, M. R.; GUY, F.; UGGLA, A.; TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 111, n. 5, p. 563-568, 1995.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary Pathology*, v. 28, n. 2, p. 110-116, 1991

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P. A. Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. *The Veterinary Record*, v. 137, n. 24, p. 611-613, 1995.

BARR, B. C.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. W.; BONDURANT, R. H.; ARDANS, A. A.; OLIVER, M. N.; CONRAD, P. A. Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic*, v. 6, n. 4, p. 207-215, 1994.

BARR, B.; J. P. DUBEY; D. LINDSAY; J.P.REYNOLDS; S.J. WELLS. Neosporosis, its prevalence and economic impact. *Veterinary Exchange*, v. 20, n. 8, p. 4-15, 1998.

BARTA, J. R.; DUBEY, J. P. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitology Research*, v. 78, n. 8, p. 689-694, 1992.

BASSO, W.; VENTURIM, L.; VENTURINI, M. C.; HILL, D. E.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DUBEY, J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *The Journal of Parasitology*, v. 87, n. 3, p. 612-618, 2001a.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M. C.; MOORE, P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *The Journal of Parasitology*, v. 87, n. 4, p. 906-907, 2001 b.

BASZLER, T. V.; KNOWLES, D. P.; DUBEY, J. P.; GAY, J. M.; MATHISON, B. A.; MCELWAIN, T. F. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 6, p. 1423-1428, 1996.

BASZLER, T. V.; LONG, M. T.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International Journal Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1635-1646, 1999a.

BASZLER, T.V.; GAY, L.J.; LONG, M.T.; MATHINSON, B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, 1999b.

BERGERON, N.; GIRARD, C.; PARE, J.; FECTEAU, G.; ROBINSON, J.; BAILLARGEON, P. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, n. 2, p. 173-175, 2001.

BJERKAS, I.; DUBEY, J.P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 32, n. 3, p. 407-410, 1991.

BJERKAS, I.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 1, n. 2, p. 214-221, 1994.

BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift fuer Parasitenkunde*, v. 70, n. 2, p. 271-274. 1984.

BJÖRKMAN, C.; HEMPHILL, A. Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, v. 20, n. 2, p. 73-80, 1998.

BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 68, n. 3, p. 251-260, 1997.

BJÖRKMAN, C.; LUNDEN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBEI, J.; TREES, A.J.; UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, v. 16, n. 12, p. 643-648, 1994.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BLACKMAN, M.; BANNISTER, L. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 117, n. 1, p. 11-25, 2001.

BOGER, L. A.; HATTEL, A. L. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 1, p. 1-6, 2003.

BURG, J. L.; PERELMAN, D.; KASPER, L. H.; WARE, P. L.; BOOTHROYD, J. C. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal Immunology*, v. 141, n. 10, p. 3584-3591, 1998.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats. recent advances. *Veterinary Research*, v. 29, n. 3-4, p. 289-310, 1998.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitology*, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

CAMPERO, C. M.; ANDERSON, M. L.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, H.; BRETSCHNEIDER, G.; POSO, M. A. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *The Veterinary Record*, v. 143, n. 8, p. 228-229, 1998.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; EPERON, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology*, v. 126, n. 4, p. 303-312, 2003b.

CANNAS, A.; NAGULESWARAN, A.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMic3 and Ribi adjuvant. *Journal Parasitology*, v. 89, n. 1, p. 41-50, 2003a.

CHO, J. H.; CHUNG, W. S.; SON, K.; NA, B.; KANG, S.; SONG, C.; KIM, T. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 43, n. 1, p. 19-25, 2005.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *Journal of Parasitology*, v. 81, n. 5, p. 730-732, 1995.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; TOIVIO-KINNUNAN, M. A.; BLAGBURN, B. L. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *American journal of veterinary research*, v. 55, n. 12, p. 1717-1722, 1994.

CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M. L.; ROWE, ID.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. A.; DUBEY, J.P.; DUHAMIEL, G.; BARR, B.C. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 5, n. 4, p. 572-578, 1993a.

CONRAD, P.A.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.L.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J.P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. *In vivo* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology*, v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993b.

DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; WILLIAMS, D. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research of Veterinary Science*, v. 70, n. 2, p. 163-168, 2001.

DAVISON, H.C.; FRENCH, N.P.; TREES, A.J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *The Veterinary Record*, v. 144, n. 20, p. 547-550, 1999b.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1683-1689, 1999a.

DAVISON, H.C.; TREES, A.J.; GUY, F.; OTTER, A.; HOLT, J.J.; SIMPSON, V.R.; JEFFREY, M. Isolation of bovine *Neospora* in Britain. *The Veterinary Record*, n.6, p. 607, 1997.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 2, p.209-215, 2001.

DUBEY, J. P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M. C.; LIDDELL, S.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal Parasitology*. v. 8, n. 28, p. 1293-1304, 1998.

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

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; ADAMS, D. S.; MCALLISTER, M. M.; ANDERSON-SPRECHER, R.; BASZLER, T. V.; KWOK, O. C.; LALLY, N. C.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal Parasitology*, v. 83, n. 6, p. 1063-1069, 1997.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 214, n. 8, p. 1160-1163, 1999.

DUBEY, J.P., BUXTON, D., WOUDE, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, n. 4, p. 267-289, 2006.

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

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADAMS, D.S.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B.L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, n. 3, p. 329-336, 1996.

DUBREMETZ, J. F.; GARCIA-REGUET, N.; CONSEIL, V.; FOURMAUX, M. N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal Parasitology*, v. 28, n. 7, p. 1007-1013, 1998.

ELLIS, J. T.; RYCE, C.; ATKINSON, R.; BALU, S.; JONES, P.; HARPER, P. A. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 120, n. 4, p.383-390, 2000.

ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 7, p. 1053-1060, 1998.

ELLIS, J.T.; McMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.; HARPER, P.A-W. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1589-1596, 1999.

EPERON, S.; K. BRONNIMANN, A.; HEMPHILL, B. GOTTSTEIN. Susceptibility of B cell deficient C57Bl/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, v. 21, n. 5, p. 225-236,1999.

FRÖSSLING, 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, 2003.

FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *Journal Parasitology*, v. 84, n. 4, p.753-758, 1998.

GAZZINELLI, R. T.; A. BREZIN, Q.; LI, R. B.; NUSSENBLATT, C.; CHAN, C. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . *Experimental Parasitology*, v. 78, n. 2, p. 217–229, 1994.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 13, p. 6115-6119, 1993.

GONDIM, L. F.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal Parasitology*, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International. Journal for Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

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

GONDIM, L.F.P.; SARTOR, I.F.; HASEGAWÀ, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 86, n. 1, p. 71-75, 1999.

GONZÁLEZ, L.; BUXTON, D.; ATXAERANDIO, R.; ADURIZ, G.; MALEY, S.; MARCO, J. C.; CUERVO, L. A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Veterinary Research*, v. 144, n. 6, p. 145-150, 1999.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THÜR, B.; BRUCKNER, L.; MÜLLER, N.; KAUFMANN, H.; WALDVOGEL. A Molecular and immunodiagnostic studies of bovine neosporosis in Switzerland. *Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde*, v. 141, n. 2, p. 59-68, 1999.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THUR, B.; BUSATO, A.; STARK, K. D.; MÜLLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *International Journal Parasitology*, v. 28, n. 4, p. 679-691, 1998.

GRAHAM, D.A.; CALVERT, V.; WHYTE, M. MARKS, J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Veterinary Record*, v. 144, n. 24, p. 672-673, 1999.

HALDORSON, G. J.; JAMES, B.; STANTON, B. A.; MATHISON, C. E.; SUAREZ, C.E.; BASZLER, T.V. *Neospora caninum*: antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. *Experimental Parasitology*, v. 112, n. 3, p. 172-178. 2005b.

HALDORSON, G.J.; MATHISON, B.A.; WENBERG, K.; CONRAD, P.A.; DUBEY, J.P.; TREES, A.J.; YAMANE, I.; BASZLER, T.V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *International Journal for Parasitology*, v.35, n.13. p. 1407-1415, 2005a.

HARKINS, D.; CLEMENTS, D. N.; MALEY, S.; MARKS, J.; WRIGHT, S.; ESTEBAN, I.; INNES, E. A.; BUXTON, D. Western blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. *Journal Comparative Pathology*, v. 119, n. 1, p. 45-55, 1998.

HEMPHILL A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.

HEMPHILL, A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infection Immunology*, v. 64, n. 10, p. 4279-4287, 1996.

HEMPHILL, A.; FELLEISEN, R.; CONNOLLY, B.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; MULLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology*, v. 115, n. 6, p. 581-590, 1997b.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology*, v. 115, n. 4, p. 371-380, 1997a.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, v. 29, n. 8, p. 1175-1188, 1999.

HEMPHILL, A.; GAJENDRAN, N.; SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; JENKINS, M. Identification and characterization of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal Parasitology*, v. 28, n. 4, p. 429-438, 1998.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research*, v. 82, n.6, 497-504, 1996.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 112, n. 2, p. 183-197, 1996.

HO, M. S.; BARR, B. C.; MARSH, A. E.; ANDERSON, M. L.; ROWE, J. D.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G.; SVERLOW, K. W. ; DUBEY, J. P. ; CONRAD, P. A. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. *Journal Clinical Microbiology*. v. 34, n. 5, p.1203-1208, 1996.

HO, M. S.; BARR, B. C.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A.; MARSH, A. E.; CONRAD, P. A. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 3, p. 508-514, 1997b.

HO, M. S.; BARR, B. C.; TARANTAL, A. F.; LAI, L. T.; HENDRICKX, A. G.; MARSH, A. E.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Detection of *Neospora* from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. *Journal Clinical Microbiology*, v. 35, n. 7, p. 1740-1745, 1997a.

HOLMDAHL, O. J.; MATTSSON, J. G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*, v. 112, n. 2, p. 177-182, 1996.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International. Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1489-1496, 1999.

HOWE, D. K.; TANG, K.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D.. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 3, p. 611-615, 2002.

HOWE, D.K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L.D.; The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, v. 65, n. 11, p. 5322- 5328, 1998.

HUANG, C.C.; YANG, C. H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y. K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary research*, v. 35, n.3, p. 283-290, 2004.

HURKOVAI, L.; HALOVAI, D.; MODRY, D. The prevalence of *Neospora caninum* antibodies in bulk milk of dairy herds in the Czech Republic: a case report. *Veterinary Medical*, v. 50, n. 12, p. 549–552, 2005.

INNES E.A, ANDRIANARIVO AG, BJÖRKMAN C, WILLIAMS DJL, CONRAD PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination, *Trends Parasitology*, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

INNES, E. A.; PANTON, W. R.; MARKS, J.; TREES, A. J.; HOLMDAHL, J.; BUXTON, D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology*, v. 113, n. 1, p. 95-100, 1995.

JENKINS, M. C., BASZLER, T., BJÖRKMAN, C., SCHARES, G., WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *International Journal of Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 631-636, 2002.

JENKINS, M. C.; CAVER, J. A.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON, T. C.; ROMAND, S.; VINYARD, B.; UGGLA, A.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 1-2, p. 17-26, 2000.

JENKINS, M. C.; WOUDA, W.; DUBEY, J. P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 4, n. 3, p. 270-274, 1997.

KASPER, L.H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*. v..57, n. 3, p. 668-672, 1989.

KAUFMANN, H.; YAMAGE, M.; RODITI, I.; DOBBELAERE, D.; DUBEY, J. P.; HOLMDAHL, O. J.; TREES, A.;GOTTSTEIN, B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Molecular Cell Probes*, v. 10, n. 4, p. 289-297, 1996.

KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ, M.; BJÖRKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPHILL, A. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infection and immunity*, v. 70, n. 6, p. 3187-3198, 2002.

KELLER, N.; RIESEN, M.; NAGULESWARAN, A.; VONLAUFEN, N.; STETTLER, R.; LEEPIN, A.; WASTLING, JM.; HEMPHILL, A. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. *Infection and immunity*, v. 72, n. 8, p.4791–4800. 2004.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, v. 85, n. 1, p. 24-34, 1997.

KIM, J. H.; LEE, J. K.; LEE, B. C.; PARK, B. K.; YOO, H. S.; HWANG, W. S.; SHIN, N. R.; KANG, M. S.; JEAN, Y. H.; YOON, H. J.; KANG, S. K.; KIM, D. Y. Diagnostic Survey of Bovine Abortion in Korea: With Special Emphasis on *Neospora caninum*. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 12, p. 1123-1127, 2002.

KIM, J.; SOHN, H.; HWANG, W.; WANG, E.; JEAN, Y.; YAMANE, I.; KM D. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 1-2, p. 147-154, 2000.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Molecular Biochemical of Parasitology*, v. 75, n. 2, p. 169-178, 1996b.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 3, n. 3, p. 275-279, 1996a.

LEMBERGER, K.Y.; GONDIM, L.F.P.; PESSIER, A.P.; MCALLISTER, M.M.; KINSEL, M.J. *Neospora caninum* Infection in a Free-Ranging Raccoon (*Procyon lotor*) with Concurrent Canine Distemper Virus Infection. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 4 p. 960–961, 2005.

LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1583-1587, 1999a.

LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *Journal of Parasitology*, v. 85, n. 3, p. 550-555, 1999b.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that dogs is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999b.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J.P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Americau Journal of Veterinary Research*, v. 50, n. 11, p. 1981-1983, 1989.

LINDSAY, D. S.; UPTON, S. J.; DUBEY, J. P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal of Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1521-1523, 1999a.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; COLE, RA; NUEHRING, L.P.; BLAGBURN, B.L. *Neospora*- induced protozoal abortions in cattle. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 15, n. 6, p. 882-889, 1993.

LOBATO, J., SILVA, D.A., MINEO, T. W., AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A. S.; MINEO J.R. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 1. p. 84-89, 2006.

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

LONG, M. T.; BASZLER, T. V.; MATHISON, B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, v. 84, n. 2, p. 316-320, 1998.

LOUIE, K.; CONRAD, P. A. Characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine protease (NCp65) of *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical Parasitology*, v. 2, n. 103, p. 211-223, 1999.

LOUIE, K.; NORDHAUSEN, R.; ROBINSON, T. W.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Characterization of *Neospora caninum* protease, NcSUB1 (NC-P65), with rabbit anti-N54. *Journal of Parasitology*, v. 88, n. 6, p. 1113-1119, 2002.

LOUIE, K.; SVERLOW, K. W.; BARR, B. C.; ANDERSON, M. L.; CONRAD, P. A. Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 4, n. 6, p. 692-699, 1997.

LOVETT, J. L.; HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Molecular Biochemical of Parasitology*, v. 107, n. 1, p. 33-43, 2000.

LUNDEN, A.; MARKS, J. S. W.; MALEY, E.; A. INNES. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*, v. 20, n. 11, p. 519-526, 1998.

LUNDEN, A.; PARMLEY, S.F.; BENGTSSON, K.L.; ARAUJO, F.G. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, v. 83, n. 1, p. 6-9, 1997.

MAGNINO, S.; VIGO, P.G; FABBI, M.; COLOMBO, M.; BANDI, C.; GENCFII, C. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *The Veterinary Record*, v. 144, n. 16, p. 456, 1999.

MANGER, I.D.; HEHL, A.B.; BOOTHROYD, J.C. The Surface of *Toxoplasma* Tachyzoites is Dominated by a Family of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Antigens Related to SAG1, *Infection and immunity*, v. 66, n. 5 p. 2237–2244, 1998

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *Journal of Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 983-991, 1998.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; MADIGAN, J.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; CONRAD, P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 209, n. 11, p. 1907-1913, 1996.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.; HO, M.; DUBEY, J.P. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *The Journal of Parasitology*, v. 81, n. 4, p. 530-535, 1995.

MCALLISTER, M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today*, v. 15, n. 6, p. 216-217, 1999.

McALLISTER, M.M.; BJÖRKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 217, n. 6, p. 881- 887, 2000.

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

MODRY, D.; VACLAVEK, P.; KOUDELA, B.; SLAPETA, J.R. Placentofagia - an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in caule? *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 12, p. 573, 2001.

MOSKWA B.; CABAJ W.; PASTUSIAK K.; BIEN J. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. *Acta Parasitologica*, v. 48, n. 2, p. 138-141, 2003.

MÜLLER, N.; VONLAUFEN, N.; GIANINAZZI, C.; LEIB, S. L.; HEMPHILL, A.. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 252-255, 2002.

NAM, H. W.; KANG, S. W.; CHOI, W. Y. Antibody reaction of human anti-Toxoplasma gondii positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. *Korean. Journal of Parasitology*, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

NISHIKAWA Y.; MAKALA L.; OTSUKA H.; MIKAMI T.; NAGASAWA H. Mechanisms of apoptosis in murine fibroblasts by two intracellular protozoan parasites, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*, v. 24, n. 7, p. 347-354, 2002.

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine*, v. 19, n. 11-12, p. 381-1390, 2001b.

NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Delivery of *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus. *Parasitology Research*, v. 86, n. 11, p. 934-939, 2000.

NISHIKAWA, Y.; MISHIMA, M.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 123, n. 1, p. 25-31, 2001d.

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clinical Diagnostic Laboratol Immunology*, v. 8, n. 4, p. 811-816, 2001a.

NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine*, v. 19, n. 13-14, p. 1710-1716, 2001c.

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

OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; FREIRE, RL; GONDIM, L.F.P.; MARANA, E.R.M.; SILVA, E.H.; SEDEMAKA, T.M.; DAMAS, A.C.; MATTOS, M.R; PRUDENCIO, L.B.; TSUTSUI, V.S.; SANTOS, A.P.M. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da região do norte do Paraná. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador. Anais.... Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 225,1999.

OMATA Y.; R. KANO, Y.; MASUKATA, Y.; KOBAYASHI, M.; IGARASHI, R. MAEDA, A. S. Development of *Neospora caninum* Cultured with Human Serum *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 1, p. 222–225, 2005.

PACKHAM, A.E.; SVERLOW, K.W.; CONRAD, P.A.; LOOMIS, E.F.; ROWE, J.D.; ANDERSON, M.L.; MARSH, A.E.; CRAY, C.; BARR, B. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 5, n. 4, p. 467-473, 1998.

PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 7, p. 352-359, 1995.

PARÉ, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy caule and associated calfhoo mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 2, p. 133-139, 1996.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *International journal for parasitology*, v. 4, n. 26, p. 347-351, 1996.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ESPI-FELGUEROSO, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M.. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, v. 111, n. 2-3, p.143-152, 2003.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JENSEN, L.; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerging infectious diseases*, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.

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

QUINN, H. E., ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy ? *Trends Parasitology*, v. 18, n. 9, p. 391-394, 2002.

RABENAU, K. E.; SOHRABI, A.; TRIPATHY, A.; REITTER, C.; AJIOKA, J. W.; TOMLEY, F. M.; CARRUTHERS, V. B. TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Molecular Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 537-547, 2001.

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

SAGER, H.; GLOOR, M.; BJORKMAN, C.; KRITZNER, S.; GOTTSTEIN, B. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Veterinary Parasitology*, v. 112, n. 1-2, p. 1-10, 2003.

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

SAWADA, M.; PARK, C. H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T.; HARITANI, M. Pathological findings of nude mice inoculated with bovine *Neospora*. *Journal of Veterinary Medical Sciences*, p. 59, n. 10, p. 947-948, 1997.

SCHARES, G.; CONRATHS, F. J.; REICHEL, M. P. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1659-1667, 1999a.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; SONDGEN, P.; RAUSER, M.; SCHRODER, R.; PETERS, M.; WURM, R.; SELHORST, T.; CONRATHS, F. J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*, v. 106, n. 4, p. 293-305, 2002.

SCHARES, G.; DUBREMETZ, J. F.; DUBEY, J. P.; BARWALD, A.; LOYENS, A.; CONRATHS, F. J. *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Experimental Parasitology*, v. 92, n. 2, p. 109-119, 1999b.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 80, n. 2, p. 87-98, 1998.

SCHARES, G.; RAUSER, M.; SONDGEN, P.; REHBERG, P.; BARWALD, A.; DUBEY, J.P.; EDELHOFER, R.; CONRATHS, F.J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 10, p. 1123-1130, 2000.

SCHOCK, A.; INNES, E.A.; YAMANE, I.; LATHAM, S.M.; WASTLING, J.M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 123, n. 1, p. 13-23, 2001.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 36, n. 4, p. 321-327, 1999.

SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Molecular Biochemical of Parasitology*, v. 108, n. 1, p. 39-51, 2000.

SÖNDGEN, P.; PETERS, M.; BARWALD, A.; WURM, R.; HOLLING, F.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Veterinary Parasitology*, v. 102, n. 4, p. 279-290, 2001.

SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *Journal of Protozoology*, v. 36, n. 5, p. 458-463, 1989.

STENDLUND, S.; BJORKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J.; KINDAHL, H.; UGGLA, A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, v. 83, n. 3, p. 214-219, 1997.

SUNDERMANN, C.A.; ESTRIDGE, B.H. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1725-1732, 1999.

SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-21 and Lyt-11, L3T41 T cells in mice. *Journal of Immunology*, v. 140, n. 11, p. 3943-3946, 1988.

TANAKA, T.; HAMADA, T.; INOUE, N.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 3, p. 183-191, 2000.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, n. 11, p. 1559-1562, 1996.

THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 5, p. 672-674, 1997b.

TRANAS, J., HEINZEN, R.A., WEISS, L.M.; MCALLISTER, M.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 8, p. 1195-1200, 1999.

TUO, W.; FETTERER, R.; JENKINS, M.; DUBEY, J. P. , Identification and Characterization of *Neospora caninum* Cyclophilin That Elicits Gamma Interferon. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 8, p. 5093-5100, 2005

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

VONLAUFEN, N.; GUETG, N.; NAGULESWARAN, A.; BJÖRKMAN, C.; SCHARES, G.; VON BLUMROEDER, D.; ELLIS, J.; HEMPHILL, A. *In vitro* induction and purification of *Neospora caninum* bradyzoites from Vero cells reveals differential antigen expression and localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infection and immunity*, v. 72, n. 1, p.576-583, 2004.

WALSH, C. P.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N.; ZAJAC, A. M.; JENKINS, M. C.; LINDSAY, D. S. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *International Journal .Parasitology*, v. 31, n. 3, p. 253-258, 2001.

WEISS, L.M.; FEN MA, Y.; HALONEN, S.; McALLISTER, M.M.; ZHANG, Y.W. The *in vitro* development of *Neospora caninum* bradyzoites. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1713-1723, 1999.

WILLIAMS, D. J.; MCGARRY, J.; GUY, F.; BARBER, J.; TREES, A. J. Novel ELISA for detection of *Neospora* specific antibodies in cattle. *Veterinary Research*, v. 140, p. 328-331, 1997.

WOUDA, W.; DJEKSTRA, T.; KRAMER, A. M. H.; MAANEN, C. V.; BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999.

WOUDA, W.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *The Journal of Parasitology*, v. 83, n. 3, p. 545-547, 1997.

WOUDA, W.; MOELA, A.R.; SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows that experienced a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, v. 49, n. 7, p. 1311-1316, 1998.

WOUDA, W.; MOEN, A. R.; VISSER, I. J.; VAN KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, v. 2, n. 9, p. 180-185, 1997.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction. *The Journal of Parasitology*, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

YAMANE, I.; KITANI, H.; KOKUHO, T.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMIZU, S.; KOIWAI, M.; SHIMURA, K.; YOKOMIZO, Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, n. 3, p.347-351, 2000.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A.. In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Japan. *Veterinary Research*, v. 138, n. 26, p. 652-655, 1996.

YAMANE, I.; SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; HAMAOKA, T.; HARITANI, M.; CONRAD, P. A.; PARK, C. H.; SAWADA, M.; UMEMURA, T.. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 10, n. 4, p.364-368, 1998.

3. ANEXO

CLONING AND EXPRESSION OF AN ANTIGENIC DOMAIN OF A MAJOR SURFACE PROTEIN (Nc1-p43) OF *Neospora caninum*¹

Manoel Sebastião da Costa Lima Junior², Renato Andreotti³, Alexandre Rodrigues Caetano⁵, Fernando Paiva⁴, Maria de Fátima Cepa Matos⁴

ABSTRACT

Cloning and expression of an antigenic domain of a major surface protein (Nc1-p43) of *Neospora caninum*⁵ [Cloning and expression of an antigenic determinant domain of a major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*.]. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. n. p.

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan that can infect domestic and wild canids, as well as ruminants and equines. It was described in 1988 as causing neuromuscular alterations and death in dogs. Recently, *N. caninum* has received considerable attention for its large impact on the dairy industry, given the economic losses related to breeding failures and to a decrease in productivity. ELISA diagnosis of neosporosis has not been widely used in Brazil, mostly because of the cost of assay, and thus the distribution of the disease in the country is still not well known. In order to evaluate its ability to react with sera from infected animals from the state of Mato Grosso do Sul, an antigenic determinant domain of a major surface protein (Nc-p43) was produced. The antigenic domain, located in the distal 2/3 region of the C-terminus, was amplified by polymerase chain reaction. The DNA fragments were cloned into pet100/D-TOPO vectors. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* of the BL21 Star (DE3) strain and induced to express the fused fragment of Nc-p43 as a 29-kDa protein that, when assayed with bovine *Neospora*-positive serum from a regional sample, was sensitive for identification by immunoblotting. This fragment of Nc-p43 may have use in additional studies targeted at diagnosing *N. caninum* infection and at evaluating the immunoprotection conferred by the protein fragment to animal hosts.

KEYWORDS : *Neospora caninum*, Nc-p43, antigen, recombinant protein.

¹ Supported by Fundect-MS and CNPq (Brazil)

² Graduate student, Animal Science Program, UFMS

³ Embrapa Gado de Corte, BR 262, km 4, CP 154; Campo Grande, MS 79002-970, Brazil. E-mail: andreotti@cnpgc.embrapa.br

⁴ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Brazil

⁵ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Final W5 Norte, CP 02372; Brasília DF 70770-900, Brazil

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório que pode infectar canídeos domésticos e selvagens, ruminantes e eqüinos, tendo sido descrito em 1988 por DUBEY et al. (1988), como causador de alterações neuromusculares e morte em cães. Recentemente, *N. caninum* vem recebendo atenção especial por seu grande impacto na indústria do leite, acarretando perdas econômicas relacionadas com falhas reprodutivas e com o decréscimo da produtividade. O diagnóstico de neosporose com teste ELISA não é amplamente utilizado no Brasil, principalmente devido ao custo do ensaio, e por isso o *status* da distribuição da neosporose nas diferentes regiões do país não é suficientemente conhecido. Com o objetivo de avaliar a habilidade de reagir com soros de animais infectados provenientes de Mato Grosso do Sul, foi produzido uma região domínio com um determinante antigênico de uma importante proteína de superfície (Nc-p43). O domínio antigênico dessa proteína está localizado na região 2/3 distal do C-terminal e foi amplificado por reação de polimerase em cadeia. O fragmento de DNA foi clonado em um vetor pet100/D-TOPO. O plasmídio recombinante foi transformado em *Escherichia coli* da variedade BL21 Star (DE3) e induzido a expressar o fragmento protéico de Nc-p43 como uma proteína de 29 kDa quando em contato com soro positivo para *Neospora*, mostrou-se sensível na identificação por *immunoblotting*. Tal fragmento de Nc-p43 pode ter uso em futuros estudos voltados ao diagnóstico de infecção por *N. caninum* e a avaliação de sua imunoproteção a possíveis hospedeiros.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, Nc-p43, antígenos, proteína recombinante.

INTRODUCTION

Neospora caninum is a protozoan of the phylum Apicomplexa, class Sporozoasida, family Sarcocystidae, subfamily Toxoplasmatinae, that can infect domestic and wild canids, as well as ruminants and equines. It was first described as causing neuromuscular alterations and death in dogs (DUBEY et al., 1988). Domestic dogs, which have been considered the definitive hosts of this parasite, shed oocysts in their feces after ingesting tissue cysts of *N. caninum* (MCALLISTER et al., 1998). However, more recent studies have detected the presence of oocysts of *N. caninum* in the feces of coyotes (*Canis latrans*), which also came to be regarded as definitive hosts of the protozoan (GONDIM et al., 2004).

Studies on the prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies have revealed that neosporosis has a wide geographical distribution, as it has been reported in many parts of the world, including Australia, New Zealand, Europe, Korea, Japan, Thailand, and the Americas. Dogs and cattle (both beef and dairy) are the chief species exposed to this parasite and can equally be affected (ANDERSON et

al., 2000).

In Brazil, surveys based on indirect fluorescence antibody test (IFAT) titers of 1:50 or higher showed prevalences of 26.55% for dogs in Campo Grande (OLIVEIRA et al., 2004), 8.3% out of 136 dogs older than six months in the state of Rondônia (CAÑON-FRANCO et al., 2003), and 21.6% out of 134 dogs living on dairy-cattle farms in the state of Paraná (SOUZA et al., 2002). Gennari et al. (2002), found frequencies of 10% for domiciled dogs and 25% for stray ones in the state of São Paulo.

Meira Santos et al. (1999), obtained a prevalence of 18% for dogs in the state of Bahia, whereas Belo et al. (1999), found 35% for stray dogs in the state of São Paulo.

Concerning bovine neosporosis in Brazil, the occurrence of seropositive bovines in six states was as high as 23.6%, with values increasing in animals over 24 months of age (RAGOZO et al., 2003). In the state of Mato Grosso do Sul, seropositivity ranged from 7.7% in bovines without a history of miscarriage to 43% in those with it (ANDREOTTI et al., 2004).

Recently, *N. caninum* has received considerable attention for its large impact on the dairy industry, given the economic losses related to breeding failures and to a decrease in productivity (DUBEY, 2003). ELISA diagnosis of neosporosis has not only been widely used in Brazil, mostly because of the assay's cost—one reason why the status of neosporosis distribution in the country is not well known, but also Elisa test can present cross reactivity between phylum apicomplexan parasites diagnostics, mainly when not purified antigens are used on.

The surface proteins of apicomplexan parasites are often immunodominant and seem to be of particular interest as a diagnostic tool and/or as vaccine antigens (BULOW; BOOTHROYD, 1991; LUNDEN et al., 1997). Many surface proteins of *N. caninum* have been identified, including Nc-p43 (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 1996), p29 and p35 (HOWE et al., 1998), and p38 (SCHARES et al., 2000). Although their biological functions have not been described, indirect evidence is available that at least one of these antigens (Nc-p43) is involved in the attachment of the parasite to host cells (HEMPHILL, 1996). The complete coding region of Nc-p43 has been determined (NISHIKAWA et al., 2000, 2001).

One antigenic domain of Nc-p43 from *N. caninum* is located in the distal 2/3 region of the C-terminus (SON et al., 2001) and it has been detected by ELISA (AHN et al., 2003). However, the antigenicity of these epitopes across different *N. caninum* isolates and their ability to react with sera from infected animals from the state of Mato Grosso do Sul, in Brazil, has not yet been determined.

The present paper reports the results of the cloning and expression of the distal 2/3 region of the C-terminus Nc-p43 protein from an *N. caninum* Nc-1 isolate. Also, the ability of this region to identify IgG from sera of positive bovines is evaluated.

METHODS

Parasite

N. caninum tachyzoites of the Nc-1 strain were maintained in Vero cells in DMEM supplemented with 10% FBS (Dubey et al., 1988).

Collection of samples

The blood samples were supplied by a bovine serum bank stored at 2° a 8° C for analysis of anti-*N. caninum*. Six *Neospora* positive and six *Neospora* negative bovine sera from Mato Grosso do Sul was used.

Indirect fluorescence antibody test (IFAT)

The parasites *N. caninum* (NC1) (DUBEY *et al.*, 1988) were grown in Vero cells with protozoal culture medium consisting of DMEM medium (Sigma), supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, at 37° C in 5% CO₂ humidified incubator. The parasites were maintained in media with no serum. After approximately 80% of host cells had been infected with parasite clusters, the monolayers were trypsinized and the media with parasites was collected. The IFAT slides were prepared with whole tachyzoites of *N. caninum* in accordance with Locatelli-Dittrich, 2002.

IFAT was used to detect anti-*N. caninum* antibodies in the samples. The rabbit anti-bovine IgG conjugate was purchased from VMRD (USA). The samples were tested at a dilution of 1:100 and the positive ones were pooled for Western Blot analysis (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

Polymerase chain reaction (PCR) and amplification of the Nc-p43 gene fragment

Total DNA was extracted from the tachyzoites using DNazol (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA) and used as template. PCR was performed with CAC CAA AGA GTG GGT GAC TGG A as the

forward primer and GGT AAG CTT TGC ATC TCC TCT TAA CAC as the reverse one (AHN et al., 2003).

Amplified DNAs were cloned into pet100/D-TOPO vectors (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA) and sequenced with T7 and reverse T7S. The specific oligonucleotide primers were synthesized according to the coding sequence of GenBank accession number U93870.

To determine orientation (sense/anti-sense) of insert in the plasmid, PCR was done on a subcloned pet100/D-TOPO vector (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA) with the insert Nc-p43 gene from the Nc-1 strain. The forward primer was made using a CACC sequence in the 5' region to attach in the pET100/D-TOPO plus the sequence of primer designed for the DNA segment (AHN, et., al., 2003)

Primer T7 from the vector was used as the forward primer and GGT AAG CTT TGC ATC TCC TCT TAA CAC from the insert as the reverse one respectively were used to evaluate the clones by PCR in terms of correct orientation for subcloning and expression.

Construction of recombinant plasmids and expression of fusion proteins

The amplified DNAs were inserted into pet100/D-TOPO vectors (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA), which were then used to transform *E. coli* of the TOP10 strain (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA). Once the correct orientation of the insert was confirmed, plasmids were inserted for sequencing and transformation into *E. coli* of the BL21 star strain (Invitrogen, Carlsbad, CA). The *E. coli* cells in the log phase were treated with 1mM isopropyl α -D-thiogalactoside (IPTG) for 3 h at 30 °C to induce expression of fusion proteins.

Western Blot

Western blotting was performed by the method of Towbin et al. (1979). Protein extracts were separated on 12% SDS-PAGE gels stained with Coomassie blue and transferred onto nitrocellulose (NC) sheets (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The recombinant protein was confirmed based on molecular weight on SDS-PAGE and Western blot.

To detect expression of recombinant fusion protein the His G antibody invitrogen was use in the assay. For the determination of the antigenic domain, the NC sheet was blocked by 10% rabbit serum in PBS/0.05% Tween-20 overnight. NC was then incubated with 1:25-diluted bovine serum of neosporosis (BAE et al., 2000), followed by incubation with 1:250-diluted peroxidase-conjugated

rabbit anti-bovine IgG antibody (Sigma, Saint Louis, MO). After that, NC was soaked in substrate—DAB solution (Sigma, Saint Louis, MO)—for 15 min and washed with water.

RESULTS AND DISCUSSION

With the set of primers used to amplify DNA from tachyzoites, a fragment of 732 base pairs (Fig. 1) was obtained by PCR from the Nc-1 strain of *N. caninum*. The fragment was confirmed based on its nucleotide sequence (Fig. 2).

The DNA sequencing data (Fig. 3) of the partial Nc-p43 gene of the *N. caninum*, Nc-1 strain, revealed a 99% identity with NcSRS—GenBank accession AY940488—(HALDORSON et al., 2005) and a 97% identity with Nc-p43—GenBank accession U93870 (HEMPHILL; GOTTSSTEIN, 1996).

This sequence was built in frame considering the vector design is for recombinant fusion protein consequently the forward primer with CACC sequence in the 5' region attach in the exact site and the sequence of primer designed for the DNA segment was made considering the protein expression (AHN, et., al., 2003).

The DNA product of PCR was cloned into pet100/D-TOPO vectors and *E. coli* TOP10 was transformed. The positive clones were selected by PCR using the same set of primers, as shown in Fig 2a. Primer T7 from the vector (as the forward primer) and GGT AAG CTT TGC ATC TCC TCT TAA CAC (as the reverse one) were used to evaluate the clones by PCR in terms of correct orientation for subcloning and expression (Fig 2b).

The DNA product inserted into the pet100/D-TOPO vectors was used to transform BL21 Star (DE3) *E. coli*. The recombinant plasmids transformed into this *E. coli* strain were induced to express fused fragment of Nc-p43 with the addition of IPTG. The recombinant protein was affinity-purified in a nickel-charged agarose resin. The fusion protein contained a 6xHis tag. The yield was 1.7 mg/L. The protein profile revealed a 29-KDa molecular weight when analyzed by SDS-PAGE (Fig. 4B).

The insert receive a N-terminal polyhistidine (6xHis) tag by the vector and incorporate 3Kda in its original molecular weight, instead 26 kDa for main sequence described in Ahn et al. (2003).

His tag region was used to show in Western blotting that the protein is recombinant (Fig.4C). Using IFAT for *Neospora* diagnostic six positive and six negative bovine sera were used to react with recombinant protein as antigen in the western blotting analyze. All positive sera reacted and no reaction occurred in the negative serum used as control. In the Figure 4 D and E is showed a positive and negative serum sample respectively.

Although the partial nucleotide sequence of the Nc-p43–coding gene revealed a sequence homology to the SRS-2 gene of *T. gondii* (HEMPHILL et al., 1997; HOWE et al., 1998), cross-reactivity of this antigen with *T. gondii* seems to be negligible, as determined by immunoblotting (BJERKAS et al., 1994; PARE et al., 1998; BAE et al., 2000). Further studies is necessary to develop to quantify cross-reactivity.

Changes in amino acids occurs in the antigenic domain of the distal 2/3 region of the C-terminus Nc-p43 protein. The extracts of the KBA-2 strain were more suitable as a diagnostic antigen than those of Nc-1 for *N. caninum* infection in Korea though no differences were found in the morphology of the parasites (BAE et al., 2000). Also, no pathologic features caused by the infection were observed in the hosts (KIM et al., 2000). Therefore the interaction of parasite antigen and antibody can be better understood when regional conditions are taken into account.

Nc-p43 is known to play an important role during the initial physical interaction between the parasite and the host cell surface (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 1996). Hemphill (1996), reported that the affinity-purified anti-Nc-p43 antibodies inhibited adhesion and invasion of *N. caninum* tachyzoites into the host cells. The inhibitory effect may result from the aggregation of tachyzoites themselves by the antibody, which merely delay the entry of tachyzoites.

The recombinant protein produced by Ncp-43, recognize positive sera for *Neospora* and no recognize negative sera from bovines of Mato Grosso do Sul region suggesting the possibility of using this protein as a antigen in diagnostics. Further immunological studies are necessary to reveal this possibility.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Embrapa Gado de Corte for the support provided for this study, and to Fundect-MS and CNPq (Brazil) for the funding for the project and the grant awarded to M.S.C.L.Jr.

REFERÊNCIAS

AHN, H.J.; KIM, S.; KIM, D.Y.; NAM, H.W. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 41, n. 3, p. 175-177, 2003.

ANDERSON, M. L.; ADRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, n. 1, p. 417-431, 2000.

ANDREOTTI, R.; PINCKNEY, R. D.; PIRES, P. P.; SILVA, E. A. Evidence of *Neospora caninum* in beef cattle and dogs in the state of Mato Grosso do Sul, center-western region, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 3, p. 129-131, 2004.

BAE, J.S.; KIM, D.Y.; HWANG, W.S.; KIM, J.H.; LEE, N.S.; NAM, H.W. Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean Journal Parasitology*, v. 38, n. 4, p.245-249, 2000.

BELO, M. A. A.; REZENDE, P. C. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães criados sob diferentes condições sanitárias. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: CBPV, 1999. p. 228.

BJERKAS, I.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 1, n. 2, p. 214-221, 1994.

BULOW, R.; BOOTHROYD, J.C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *Journal Immunology*, v. 10, n. 141, p. 3584-3591, 1991.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; SOUZA, S. L.; SILVA, J. C.; PINTER, A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.

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

DUBEY, J.P. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

GENNARI, S. M.; YAI, L. E.; D'AURIA, S. N.; CARDOSO, S. M.; KWOK, O. C.; JENKINS MC, DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 106, n. 2, p.177-179, 2002.

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMPLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

HALDORSON, G.J.; MATHISON, B.A.; WENBERG, K.; CONRAD, P.A.; DUBEY, J.P.; TREES, A.J.; YAMANE, I.; BASZLER, T.V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 13. p. 1407-1415, 2005.

HEMPHILL, A. ;GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research*, v. 82, n. 6, 497-504,1996.

HEMPHILL, A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infection Immunology*, v. 64, n. 10, p.4279-4287,1996.

HEMPHILL, A.; FELLEISEN, R.; CONNOLLY, B.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; MULLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology*, v. 115, n. 6, p. 581-590,1997.

HOWE, D.K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L.D.; The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection Immunology*, v. 65, n. 11, p.5322- 5328,1998.

KIM, J.; SOHN, H.; HWANG, W.; WANG, E.; JEAN, Y.; YAMANE, I.; KIM, D. Y. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 1-2, p. 147-154, 2000.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that dogs is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

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

LUNDEN, A.; PARMLEY, S.F.; BENGTTSSON, K.L.; ARAUJO, F.G. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, v. 83, n. 1, p.6-9, 1997.

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

MEIRA SANTOS, P. O.; VIANA DE JESUS, E. E; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; GUIMARÃES, J. E.; SOUZA, R. M.; GONDIM, L. F. P. Frequência de anticorpos contra *Neospora*

caninum em cães criados no Estado da Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador. *Anais...*Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 228.

NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Delivery of *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus. *Parasitology Reseach*, v. 86, n. 11, p.934-939,2000.

NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; NAGASAWA, H., IGARASHI I, FUJISAKI K, OTSUKA H, MIKAMI T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine*, v. 19, n. 13-14, p.1710-1716,2001.

OLIVEIRA, J. M.; MATOS, M. F. C.; OSHIRO, L. M.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in the urban area of Campo Grande, MS, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13, n. 4, p. 155-158. 2004.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998.

RAGOZO, A. M. A. R.; PAULA, V. S. O.; SOUZA, S. L. P.; BERGAMASHI, D. P.; GENNARI, S. M. Ocorrência da anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2003.

RAMASAMY. R.; RAMASAMY, M.; YASAWARDENA, S. Antibodies and *Plasmodium falciparum* merozoites. *Trends Parasitology*, v. 17, n. 4 , p.194-197,2001.

SCHARES, G.; RAUSER, M.; SONDGEM. P.; REHBERG P.; BARWALD A.; DUBEY J.P.; EDELHOFER R.; CONRATHS F.J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *International Journal Parasitology*, v. 30, n. 10, p.1123-1130, 2000.

SON, E.S.; AHN, H.J.; KIM, J.H.; KIM, D.Y.; NAM, H.W. Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum* *The Korean Journal of Parasitology*, v. 39, n. 3, p. 241-246, 2001.

SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES, J. S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná. *The Journal of Parasitology*, v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, n. 9, p.4350-4354, 1979.

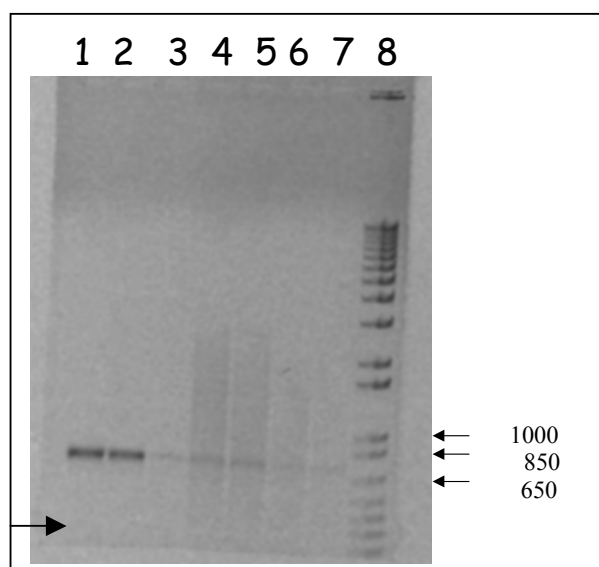


Fig. 1. PCR-amplified partial Nc-p43–coding gene of *N. caninum*, Nc-1 strain. Numbers on the right indicate base pairs. Separation in 1.2% agarose gel using Taq polymerase (1-2), platinum Pfx DNA polymerase (3-7), and molecular ladder (8). Arrow on the left indicates DNA amplification.

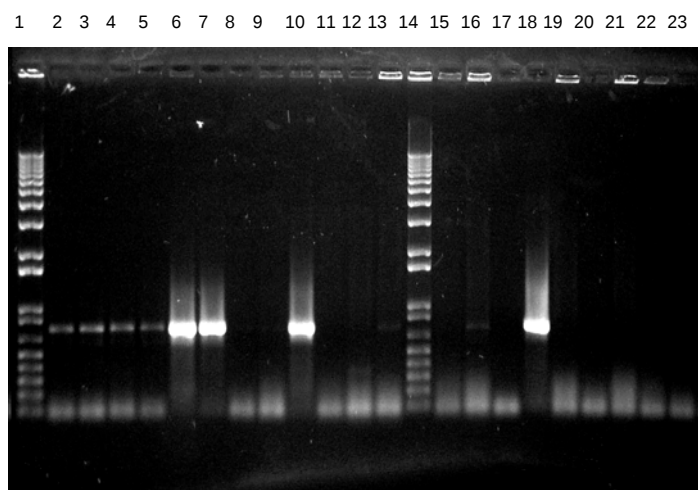


Fig. 2. a) PCR-amplified Nc-p43-coding gene fragments of plasmid in different isolated *E. coli* clones. Forward primer: CAC CAA AGA GTG GGT GAC TGG A; reverse primer: GGT AAG CTT TGC ATC TCC TCT TAA CAC (Ahn et al., 2003). DNA separation in 1.2% agarose gel. Numbers on the top designate each colony tested. **b)** PCR-amplified Nc-p43-coding gene fragments of plasmid in different isolated *E. coli* clones for identification of insert orientation. Primers: T7, from vector; GGT AAG CTT TGC ATC TCC TCT TAA CAC as reverse primer. DNA separation in 1.2% agarose gel. Numbers on the top designate each colony tested. Arrow indicates the correct orientation.

CACCAAAGAGTGGGTGACTGGAACCTCTTCAACAGGGAATAAGGATTACAATTCCCGACGAGCACT
 ACCCAGCTACGTGAAAGCTTTCCGTGTTGGTTGTAAGGCGGGTAAAAATGTTTGTGCTCAATGT
 GTATGTTCAAGTAGGGAATCAGAGGTGATCGGACAGGTGGCGCATTTGTGCTTATAGTTCCAACGT
 ACGTCTGCGTCCAATCACTGTGAATCCAGAAAACAACGGAGTGACATTAATTTGCGGACCAGACG
 GGAAGGCGTTCCCGGATGATTACATGAACCACCATTTGTACGGAAGTAGACGAATGTAAAGAACGC
 CCTTATTCCGCCGTGTTTCCTGGGTTCTCCAGTAGTTTTTTGGACTGGAGAAGCTTCCGGCGTAGCCG
 GGGCGACACTGACCATTCCCAAGGACCAGTTTCCTTCGACAGCACAGACCATCTATTTGGGCTGCA
 CTGGTCACCCGGATGATAAACAGGTCACCTGTGTGGTTCCAGTAAATATAGAAGAAGTTGCAAAAC
 CAGCAGGGGCGGATCGAACCAGGTGGTGGTTCGCAACCGGACCAATCCTCGGAGAAACGCGAC
 GGGGAACAGGTAAACAAAGGCAAACCTCCCACTGGCGGATCCGGCGGAGCAACAACCTGGAAAAC
 AAAATGCATCCCAAAACGCGAAGGACAAGGGGGAAACAGGAGGAGAGAACGGCGATTCCCCCGT
 GTTAAGAGGAGATGCAAAGCTTACC

Fig. 3. Nucleotide sequence of the Nc-p43 fragment insertion in the plasmid vector. The barr show the sequence of forward primer where CACC is the specific site of primer match with vector.

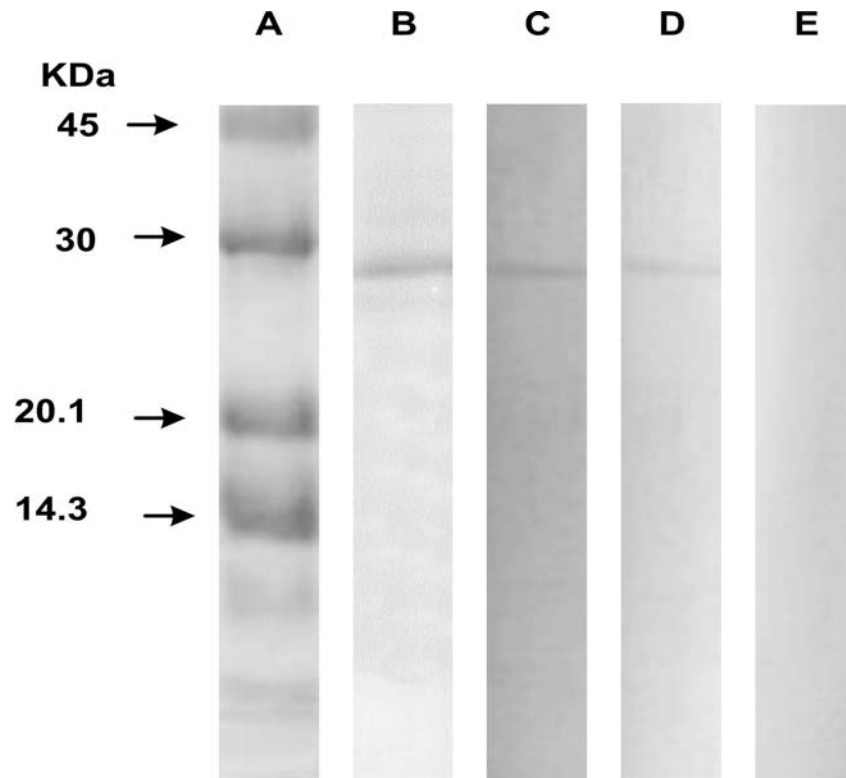


Fig. 4. a) Molecular weights of markers. **b)** SDS-PAGE (12% gel) stained with Coomassie blue of the expressed Nc-p43 fragment purified by affinity chromatography in nickel column, showing a major band of 29 kDa. **c)** Western blot detecting HisG tag. **d)** Western blot detection of Nc-p43 recombinant protein with bovine *Neospora caninum*-positive serum. **e)** Western blot detection of Nc-p43 recombinant protein with bovine *Neospora caninum*-negative serum. The positive and negative bovine serum were tested by IFAT.