

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



Tese

**Avaliação das proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 para o diagnóstico
da neosporose**

Francine Alves Sinnott

Pelotas, 2018

Francine Alves Sinnott

**Avaliação das proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 para o diagnóstico
da neosporose**

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

Orientador: Prof^a Dr^a Sibele Borsuk

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na publicação

S615a Sinnott, Francine Alves
Avaliação das proteínas recombinantes NCSRS2 e
NCSAG1 para o diagnóstico da neosporose / Francine Alves
Sinnott ; Sibele Borsuk, orientadora. – Pelotas, 2018.

134 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de
Pelotas, 2018.

1. Neospora caninum. 2. Elisa. 3. Imunodiagnóstico. 4.
Nc-p43. 5. Nc-p29. I. Borsuk, Sibele, orient. II. Título.

CDD: 616.079

Francine Alves Sinnott

Avaliação das proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 para o diagnóstico da neosporose

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

Data da Defesa: 26/02/2018

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Sibele Borsuk (Orientador)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

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

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

Prof^a. Dr^a. Maria Elisabeth Aires Berne
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a. Dr^a. Nara Amélia da Rosa Farias
Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a uma pessoa de extrema importância para a minha formação...a uma amiga que sempre torceu pelo meu sucesso...a uma parceira que acreditou sempre em mim, e me fez acreditar que eu tinha potencial...a uma pessoa única, ímpar e insubstituível...e que infelizmente não estará presente hoje para me dar aquele abraço tão sincero...mas eu sei, que onde quer que ela esteja, hoje estará festejando junto comigo...afinal esta tese também é dela....

Dedico este trabalho a minha eterna orientadora Cláudia Hartleben! Meu fraterno “Muito Obrigada”!!!!

Como disse um dia Chico Xavier “A saudade é uma dor que fere nos dois mundos”.

Agradecimentos

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

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

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

Ao meu pai, por ser uma das pessoas mais importantes da minha vida, e por ser minha fonte de inspiração, te amo de mais Carlão, obrigada por tudo!

À minha filha, minha melhor amiga, confidente e parceira, que tem a melhor massagem após um dia difícil de trabalho, e que me fez, e faz, tentar ser sempre uma pessoa melhor, sem ela nada faria sentido, te amo muito neguinha.

Ao meu esposo, pessoa que sempre me incentivou, nunca deixou minha “peteca” cair, sempre esteve ao meu lado, divertindo meus dias, me auxiliando nessa difícil trajetória da pós-graduação, te amo para sempre.

A minha mãe, que mesmo morando a quilômetros de distância, sempre se fez presente em minha vida, te amo e sinto muito a sua falta.

Aos meus irmãos, pedaços de mim, e que certamente são os maiores presentes que meus pais me deram, eu amo demais vocês.

As minhas amigas Berta e Natália, que são fundamentais, irmãs que eu pude escolher, que sempre vibraram pelas minhas conquistas, eu amo vocês best's.

Aos meus colegas e amigos do meu eterno “Lab 10”, nossas rodadas de mate sempre serviram para recarregar as baterias e voltar mais ativa para as bancadas.

Aos colegas e amigos do Lab 3, valeu por toda ajuda, pela receptividade e parceria, agradeço especialmente a Mara e a Karen, vocês são maravilhosas.

E em especial a minha orientadora Sibele, que abriu suas portas para me receber com todo o carinho, sendo peça chave na conclusão deste trabalho, pois quando nada dava certo ela arregaçou as mangas e foi para a bancada para me “mostrar como é que se faz”, obrigada de todo o coração, você será inesquecível.

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

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

Muito obrigada!

A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.

CHICO XAVIER

Resumo

SINNOTT, Francine Alves. **Avaliação das proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 para o diagnóstico da neosporose.** 2018. 134f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa. Possui como hospedeiros definitivos os canídeos, doméstico e silvestre, e uma variedade de animais podem atuar como hospedeiros intermediários, destacando-se os bovinos e os ovinos, como os animais de produção mais estudados para a neosporose no Brasil. O diagnóstico padrão desta parasitose é feito através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), porém, devido a semelhanças morfológicas e antigênicas de *N. caninum* com outros protozoários do seu filo, como *Toxoplasma gondii*, podem ocorrer resultados falsos positivos. Com o objetivo de diminuir as reações cruzadas com outros coccídeos, proteínas específicas do protozoário vêm sendo testadas em diferentes ensaios. As proteínas de superfície celular ganham maior atenção por serem responsáveis pelo primeiro estímulo ao sistema imunológico dos hospedeiros, salientando-se as proteínas NcSRS2 e NcSAG1, como sendo as proteínas mais amplamente utilizadas em estudos de diagnósticos da neosporose. O objetivo deste trabalho, foi desenvolver um ensaio no formato ELISA indireto para o diagnóstico da neosporose bovina e ovina, utilizando proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 (rNcSRS2 e rNcSAG1) associadas. Para tal, o vetor pET100/D TOPO/NcSRS2, previamente construído foi utilizado para produzir a proteína rNcSRS2 em *Escherichia coli* cepa BL21 Star (DE3). Para a produção da proteína rNcSAG1, o gene sintético contendo a sequência codificadora da proteína, foi ligado ao vetor de expressão pAE. O plasmídeo recombinante pAE/NcSAG1, foi utilizado para expressar a proteína NcSAG1 em *E. coli* cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP. As proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1 foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna carregada com níquel e testadas quanto ao seu reconhecimento por anticorpos presentes em soros de ovinos e bovinos naturalmente infectados, através de *Western blot* e ELISA. Para o desenvolvimento do ELISA, 216 soros bovinos e 154 soros ovinos, previamente caracterizados pela IFI, foram utilizados em um ELISA indireto utilizando as proteínas (rNcSRS2 e rNcSAG1) isoladas e em associação. A sensibilidade e especificidade do ELISA com a proteína rNcSRS2 isolada foi de 91,5% e 96,4% para bovinos e 89,6% e 96,3% para ovinos, respectivamente, e a sensibilidade e especificidade do ELISA com a proteína rNcSAG1 isolada foi de 84,9% e 97,3% para bovinos e 89,6% e 92,6% para ovinos, respectivamente. Quando testadas as proteínas associadas, a sensibilidade e especificidade foram de 98,1% e 99,1% para bovinos e 100% e 97,2% para ovinos, respectivamente. Os resultados apresentados, indicam que o ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 é um método sensível e específico para a detecção de anticorpos em populações de bovinos e ovinos, sendo uma alternativa para o diagnóstico da neosporose.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; ELISA; imunodiagnóstico; NcP43; NcP29

Abstract

SINNOTT, Francine Alves. **Evaluation of the recombinant proteins NcSRS2 and NcSAG1 for the diagnosis of neosporosis.** 2018. 134f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan, belonging to the Apicomplexa phylum. It has as final hosts canids, domestic and wild, and a variety of animals can act as intermediate hosts, standing out cattle and sheep, as the most studied production animals for neosporosis in Brazil. The standard diagnosis of this parasitosis is through the indirect immunofluorescence (IFI) technique, however, due to the morphological and antigenic similarities of *N. caninum* with other protozoa of its phylum, such as *Toxoplasma gondii*, false positive results may occur. In order to reduce cross-reactions with other coccidians, protozoan-specific proteins have been tested in different experiments. The cell surface proteins gain greater attention because they are responsible for the first stimulus to the host's immune system, emphasizing the proteins NcSRS2 and NcSAG1, being the proteins most widely used in studies of diagnosis of neosporosis. The objective of this work was to develop an indirect ELISA assay for the diagnosis of bovine and ovine neosporosis using recombinant NcSRS2 and NcSAG1 recombinant proteins (rNcSRS2 and rNcSAG1). For this purpose, the previously constructed pET100 / D TOPO / NcSRS2 vector was used to produce the rNcSRS2 protein in *Escherichia coli* strain BL21 Star (DE3). For the production of rNcSAG1 protein, the synthetic gene containing the protein coding sequence was ligated to the pAE expression vector. Recombinant plasmid pAE / NcSAG1, was used to express the NcSAG1 protein in *E. coli* strain BL21-CodonPlus (DE3) -RP. The rNcSRS2 and rNcSAG1 proteins were purified by nickel loaded column affinity chromatography and tested for recognition by antibodies present in naturally infected sheep and bovine sera via Western blot and ELISA. For the development of the ELISA, 216 bovine sera and 154 ovine sera, previously characterized by the IFI, were used in an indirect ELISA using the proteins (rNcSRS2 and rNcSAG1) isolated and in association. The sensitivity and specificity of the ELISA with the isolated rNcSRS2 protein were 91.5% and 96.4% for cattle and 89.6% and 96.3% for sheep, respectively, and the sensitivity and specificity of the ELISA with rNcSAG1 isolates were 84.9% and 97.3% for cattle and 89.6% and 92.6% for sheep, respectively. When tested the associated proteins, the sensitivity and specificity were 98.1% and 99.1% for cattle and 100% and 97.2% for sheep, respectively. The results show that the rNcSRS2 / rNcSAG1 ELISA is a sensitive and specific method for the detection of antibodies in bovine and ovine populations, being an alternative for the diagnosis of neosporosis.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; ELISA; immunodiagnostic; NcP43; NcP29

Lista de figuras (Manuscrito)

Figura 1	<i>Western blotting</i> para avaliação da antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1	75
Figura 2	ELISA indireto realizado com as proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual ou em associação, testadas contra 106 soros bovinos positivos e 110 soros bovinos negativos para neosporose, obtida através do <i>Receiver Operating Characteristic</i> (ROC)	76
Figura 3	ELISA indireto realizado com as proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual ou em associação, testadas contra 48 soros ovinos positivos e 106 soros ovinos negativos para neosporose, obtida através do <i>Receiver Operating Characteristic</i> (ROC)	77
Figura 4	Análise ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) para o ELISA Indireto com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os soros bovinos	78
Figura 5	Análise ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) para o ELISA indireto com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os soros ovinos	79
Figura 6	Valores preditivos positivos (losango) e negativos (quadrados) para o ELISA com as proteínas em associação, em níveis de prevalência variáveis de neosporose. Os valores foram determinados pela análise ROC, baseando-se na sensibilidade e especificidade do ELISA.....	80

Lista de figuras (Patente)

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose, confirmando a ligação do vetor pAE ao gene <i>sag1</i>	108
Figura 2	<i>Western blotting</i> demonstrando a banda reativa da proteína rNcSAG1, em <i>E. coli</i> cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP, utilizando anticorpo monoclonal anti- 6xhistidina.....	109
Figura 3	<i>Western blotting</i> demonstrando a antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, quando confrontadas com soros de animais naturalmente infectados	110
Figura 4	ELISA indireto realizado com as proteínas recombinantes (rNcSRS2 e rNcSAG1), de forma individual e em associação, como antígenos, testadas com 106 soros bovinos positivos e 110 soros bovinos negativos para <i>Neospora caninum</i> , obtida através do <i>Receiver Operating Characteristic (ROC)</i>	111
Figura 5	ELISA indireto realizado com as proteínas recombinantes (rNcSRS2 e rNcSAG1), de forma individual ou em associação, como antígenos, testadas com 48 soros ovinos positivos e 106 soros ovinos negativos para <i>Neospora caninum</i> , obtida através do <i>Receiver Operating Characteristic (ROC)</i>	112
Figura 6	Análise ROC (<i>Receiver operating characteristics</i>) para o ELISA com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os soros bovinos	113
Figura 7	Análise ROC (<i>Receiver operating characteristics</i>) para o ELISA com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os soros ovinos	114
Figura 8	Valores preditivos positivos (losango) e negativos (quadrados) para o ELISA com as proteínas em associação, em níveis de prevalência variáveis de neosporose bovina e ovina. Os valores foram determinados pela análise ROC, baseando-se na sensibilidade e especificidade do imunoensaio.....	115

**Lista de tabelas
(Introdução Tese)**

Tabela 1 Prevalência da neosporose em estados brasileiros 16

.

(Artigo)

Tabela 1	The antigens that are most commonly used to develop diagnostics for neosporosis	48
Tabela 2	PCR based methods used for detection of the parasite <i>N. caninum</i> in different animal species	49
Tabela 3	The commercial tests that are cited for neosporosis diagnosis during the last five years.....	50
Tabela 4	Serological assays developed for antibodies against <i>N. caninum</i>	51

Sumário

1 Introdução geral	14
2 Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 Artigo.....	22
Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011-2016).....	23
Abstract.....	24
1. Introduction	24
2. Study criteria	26
3. <i>Neospora caninum</i> antigens	27
4. Diagnosis of neosporosis	27
4. 1. Polymerase chain reaction	27
4. 2. Serological assays	29
4. 2. 1. Commercial kits.....	29
4. 2. 2. Indirect fluorescence antibody test	30
4. 2. 3. Development of new serological diagnostics for neosporosis	31
5. Final considerations	33
6. References.....	33
4 Manuscrito	53
Associação das proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 de <i>Neospora caninum</i> no desenvolvimento de um ELISA indireto para a neosporose	54
Resumo	55
1. Introdução.....	56
2. Materiais e Métodos	57
2. 1. Obtenção dos soros.....	57
2. 2. Expressão e purificação da proteína recombinante rNcSRS2	58
2. 3. Clonagem do gene sag1	59
2. 3. 1. Expressão e purificação da proteína recombinante rNcSAG1	59
2. 4. Teste de antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1	61
2. 5. Desenvolvimento do ELISA indireto.....	62

2. 6. Análise estatística	62
3. Resultados	63
3. 1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1.....	63
3. 2. Teste de antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1	63
3. 3. ELISA indireto.....	64
3. 5. Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo.....	64
4. Discussão	65
5. Conclusão	67
Referências	67
5 Patente	
Associação de proteínas recombinantes de <i>Neospora caninum</i> no desenvolvimento de imunodiagnóstico para a neosporose	81
Resumo	82
Relatório Descritivo	83
Reivindicações	107
SEQ ID NO:1 – Sequência do gene NcSAG1.....	116
SEQ ID NO:2 – CDS NcSAG1.....	117
SEQ ID NO:3 – Gene sintético NcSAG1.....	118
SEQ ID NO:4 – Sequência da proteína NcSAG1	119
SEQ ID NO:5 – Sequência do gene NcSRS2	120
SEQ ID NO:6 – Amplificação do gene NcSRS2: Primer Foward.....	121
SEQ ID NO:7 – Amplificação do gene NcSRS2: Primer Reverse	122
SEQ ID NO:8 – CDS NcSRS2	123
SEQ ID NO:9 – Sequência da proteína NcSRS2.....	124
6 Conclusões	125
Referências	126

1
2
3
4
5

6 1 INTRODUÇÃO GERAL

7

8 *Neospora caninum* é um parasito heteroxeno, pertencente ao filo
9 Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida e família Sarcocystidae.
10 Este protozoário foi isolado primeiramente por Dubey et al. (1988) de tecidos de
11 cães com paralisia cerebral. É o agente causador da doença conhecida por
12 neosporose, sendo esta uma das principais causas de abortos em bovinos no
13 mundo, tanto em bovinos de leite quanto de corte (ANDREOTTI et al., 2009;
14 COBADIOVA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014). Já em ovinos, não é considerado
15 como uma causa relevante de abortos em animais naturalmente infectados (HOWE,
16 et al., 2012). *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, sendo os canídeos,
17 domésticos e silvestres, os hospedeiros definitivos e os hospedeiros intermediários
18 podendo ser uma ampla variedade de mamíferos, como bovinos, ovinos, equinos,
19 caprinos, entre outros (AZEVEDO et al., 2010; TEMBUE et al., 2011; DONG, et al.,
20 2012; PAIZ et al., 2015). A neosporose canina se caracteriza por paralisia muscular,
21 enquanto a neosporose bovina apresenta abortos e mortalidade neonatal (HIASA,
22 et al., 2012). Já a nesporose ovina ocorre com menor frequência, e está associada a
23 infecções congênitas e nascimentos de cordeiros fracos (DUBEY & LINDSAY, et al.,
24 1996, ROSSI et al., 2011).

25 Não há evidencias de que a infecção por *N. caninum* seja zoonótica, no
26 entanto, há relatos na bibliografia, da soropositividade da doença em humanos
27 imunocomprometidos. Em 2015, um grupo de pesquisadores brasileiros avaliou a
28 soropositividade em amostras de pacientes HIV positivos. Neste estudo 26,1 % dos
29 pacientes no Mato Grosso do Sul e 31,2% de pacientes no Paraná, apresentavam
30 anticorpos contra *N. caninum*, demonstrando que pode ser uma infecção a emergir
31 nessa população (OSHIRO, et al., 2015).

32 O ciclo desta enfermidade se dá através da eliminação de oocistos não
33 esporulados nas fezes de canídeos infectados. Os oocistos se tornam infectantes no
34 ambiente, contendo 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada, sendo ingeridos
35 juntamente com a pastagem e água pelos hospedeiros intermediários (DUBEY;

1 LINDSAY, 1993; MACHADO et al., 2011). Os esporozoítos são liberados e invadem
2 as células do trato intestinal, transformando-se em taquizoítos, representando a
3 forma aguda da doença (WESTON et al., 2012; GOODSWEN et al., 2013). Os
4 taquizoítos se reproduzem de forma rápida e podem ser encontrados em células do
5 sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular,
6 hepatócitos, entre outras (DUBEY et al., 1988; GALGUT et al., 2010). A principal
7 localização do parasito é no sistema nervoso central, mais especificamente no
8 cérebro, podendo ser encontrado com menor ocorrência em macrófagos e
9 fibroblastos (JIMENEZ-RUIZ et al., 2012). No interior das células, os taquizoítos
10 transformam-se em bradizoítos, com multiplicação mais lenta, conferindo a fase
11 crônica da doença nos hospedeiros intermediários (GONDIM et al., 1999;
12 MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2011). Os hospedeiros definitivos se infectam ao
13 ingerirem os tecidos de hospedeiros intermediários contendo cistos com bradizoítos,
14 os quais, no epitélio intestinal, se diferenciam em formas sexuadas, multiplicando-se
15 e gerando oocistos que são liberados nas fezes (DUBEY, 1999; ASMARE, et al.,
16 2013). Os hospedeiros definitivos também podem se auto-infectar, quando
17 consomem suas próprias fezes contaminadas ou quando consomem fezes de outros
18 animais infectados, se tornando hospedeiro intermediário e desenvolvendo cistos
19 teciduais (JARDINE, 1996).

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

24 No Brasil, muitos grupos de pesquisa vêm estudando esta parasitose devido a
25 sua prevalência e prejuízos econômicos gerados para a pecuária. Na tabela 1,
26 observam-se valores de prevalência da neosporose em estados brasileiros nos
27 últimos anos, onde a maior parte dos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de
28 identificar a doença nas populações de caninos, bovinos e ovinos, provavelmente
29 por serem as espécies mais acometidas por esta parasitose. No entanto, a
30 identificação da prevalência em outras espécies animais também foram relatadas.
31 Conforme se pode observar na tabela 1, as prevalências divergem bastante entre
32 animais da mesma espécie, pode-se sugerir que estas diferenças ocorram devido a
33 variações nas regiões do estudo, ao ponto de corte utilizado no diagnóstico, à

1 presença de antecedentes de abortos, bem como nas condições de higiene e
 2 manejo entre as criações estudadas.

3

4 **Tabela 1:** Prevalência da neosporose em estados brasileiros.

Cidade - Estado	Técnica	Hospedeiro	Nº de amostras	Prevalência %	Referência
Oeste e Planalto Serrano – SC ^a	IFI	Caprino	654	4,58	(Topazio et al., 2014)
Curitiba – PR	IFI	Canino	26	11,5	(Constantino et al., 2016)
Curitiba - PR	IFI	Canino	147	11,56	(Plugge et al., 2011)
Centro-Oeste – SP ^b	IFI	Ovino	596	59,23	(Paiz et al., 2015)
Brotas - SP	IFI	Canino	342	4,97	(Langoni et al., 2013)
Caçapava – SP	IFI	Bovino	2750	3,32 – 11,71 ^c	(Cardoso et al., 2012)
Lagoinha – SP	IFI	Bovino	1291	3,9 – 22,06 ^c	
Pindamanhangaba – SP	IFI	Bovino	2154	28,57 – 37,10 ^c	
Avaré - SP	ELISA indireto	Bovino	615	21,6 – 38,9 ^c	(Piagentini et al., 2012)
Botucatu e Pardinho – SP	IFI	Ovino	382	12,8	(Langoni et al., 2011)
Ibitinga, Itápolis, Borborema e Tabatinga - SP	IFI	Ovino Canino	1497 42	8,0 4,08	(Machado et al., 2011)
Cordeirópolis, Valparaíso, Andradina, Cosmorama, São Paulo e Ribeirão Preto – SP	IFI	Capivara	63	3,0	(Valadas et al., 2010 ^a)
Pinheiros – ES	IFI	Canino	187	11,76	(Acosta et al., 2016)
MG ^d	IFI	Caprino	667	10,7	(Andrade et al., 2013)
Uberlândia – MG	IFI	Ovino	155	47,1	(Rossi et al., 2011)
Ibicaraí - BA	IFI	Bovino	196	3,1	(Magalhães et al., 2014)
BA e PE ^e	PCR	Pardal	40	7,5	(Gondim et

						al., 2010)
Ibiririm - PE	IFI	Caprino Ovino	319 81	26,6 64,2		(Tembue et al., 2011)
Meceió – AL	IFI	Canino	237	4,2		(de Sousa et al., 2012)
AL ^f	IFI	Ovino	343	9,6		(Faria et al., 2010)
Patos e Esperança - PB	IFI	Suíno	190	3,2		(Feitosa et al., 2014)
Patos - PB	IFI	Suíno	130	3,1		(Azevedo et al., 2010)
PA ^g	IFI	Canino	129	12,4		(Valadas et al., 2010b)
Araguaína - TO	ELISA indireto IFI	Canino	204	43,1		(Raimundo et al., 2015)
Tapirapé e Karajá ^h	IFI	Canino	325	9,8		(Minervino et al., 2012)

^a Amostras foram coletadas em 57 municípios do estado de Santa Catarina.

^b Amostras foram coletadas em 2 abatedouros do estado de São Paulo.

^c Amostras foram coletadas em 2 diferentes períodos, o primeiro resultado é da primeira coleta e o segundo resultado da segunda coleta.

^d Amostras foram coletadas de 90 fazendas de 90 municípios do estado de Minas Gerais.

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

^f Amostras coletadas em 26 rebanhos de 23 municípios do estado de Alagoas.

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

^h Comunidades indígenas da Amazônia Brasileira.

Para o diagnóstico da neosporose, exames histológicos podem sugerir a doença em fetos abortados pela visualização das lesões características causadas pelo protozoário, como encefalite não supurativa, miocardite, hepatites, etc. Os órgãos geralmente utilizados neste diagnóstico são cérebro, placenta, fígado e coração (DUBEY; SHARES, 2006). Porém, esta técnica necessita sempre da confirmação da presença do parasito já que outros protozoários poderiam causar lesões similares (DUBEY; SHARES, 2011).

A imunohistoquímica (IHC) é considerada o teste padrão ouro para a detecção do parasito em fetos abortados (KHODAKARAM-TAFTI et al., 2012). No entanto, não é sempre possível a visualização do parasito pela técnica de coloração

1 hematoxilina e eosina (HE) utilizada nos exames histológicos. Contudo, a eficiência
2 da IHC é prejudicada por amostras de tecidos de abortos autolisados (GOODSWEN
3 et al., 2013).

4 A reação em cadeia da polimerase (RCP = *Polymerase Chain Reaction -*
5 PCR) é uma ferramenta muito importante para detecção de *N. caninum*, tendo como
6 vantagens ser uma técnica rápida e possuir alta sensibilidade e especificidade.
7 Porém, devido ao parasito formar cistos teciduais, nem sempre é possível detectar o
8 DNA do protozoário na amostra utilizada (TRAMUTA et al., 2011). A PCR pode ser
9 aplicada para o diagnóstico, para o sequenciamento, quantificação de DNA do
10 protozoário e identificação de novos hospedeiros do parasito (BARTLEY et al., 2006;
11 DUBEY et al., 2011).

12 A técnica sorológica utilizada como referência para o diagnóstico da
13 neosporose é a imunofluorescência indireta (IFI), a qual utiliza taquizoítos intactos
14 fixados (FROSSLING et al., 2003; CARDOSO et al., 2012; ANDRADE et al., 2013),
15 sendo esta o primeiro ensaio sorológico descrito para o diagnóstico da doença
16 (DUBEY et al., 1988). Porém, devido à utilização de antígeno total (taquizoítos
17 inteiros) na IFI podem ocorrer reações cruzadas com o protozoário *Toxoplasma*
18 *gondii*, pois este apresenta grande similaridade morfológica e compartilha muitos
19 antígenos com *N. caninum*. Ainda, a IFI é um teste laborioso, pois necessita da
20 manutenção de cultivos de taquizoítos *in vitro* (DONG et al., 2013).

21 A utilização de antígenos de superfície celular, exclusivos da espécie *N.*
22 *caninum*, é uma alternativa para aumentar a especificidade dos testes sorológicos,
23 evitando assim resultados falsos – positivos (JIMENEZ-RUIZ et al., 2013). Os
24 antígenos de superfície vêm sendo utilizados em ensaios imunoenzimáticos (ELISAs
25 e *imunoblotting*), aglutinação em látex, os quais foram descritos visando o aumento
26 da sensibilidade e especificidade dos testes (HU et al., 2011; MORAVEJI et al.,
27 2012; DONG et al., 2013; HE et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; DE SA et al.,
28 2014; GHALMI et al., 2014; SINNOTT et al. 2017).

29 O antígeno NcSRS2 (**SAG 1 – Related Sequences**) é expresso em taquizoítos
30 e bradizoítos, portanto é detectável tanto na fase aguda quanto na fase crônica da
31 doença, e possui função importante no reconhecimento, adesão e invasão da célula
32 hospedeira. A imunogenicidade e antigenicidade desta proteína já foram
33 demonstradas em estudos anteriores utilizando a proteína de forma recombinante
34 (HOSSEININEJAD et al., 2010; SINNOTT et al., 2014; PINHEIRO et al., 2018). O

1 antígeno NcSAG1 (**Surface Antigen Glycoprotein**) é um dos principais抗ígenos de
2 superfície dos taquizoítos, sendo expresso só na fase aguda da doença, é
3 imunodominante e também está envolvido com as primeiras interações com as
4 células do hospedeiro, além de ser considerada uma das proteínas mais
5 imunogênicas de *N. caninum*. (WILKOWSKY et al., 2011; DONG, et al., 2013). O
6 gene NcSRS2 apresenta 44% de homologia com *TgSRS2* de *T. gondii*, já o gene
7 NcSAG1 apresenta uma homologia de 53% com *TgSAG1*, também de *T. gondii*
8 (HOWE et al., 1998). Para evitar reações cruzadas nos ensaios imunológicos que
9 utilizam estas proteínas como alvos, muitos trabalhos utilizam estes抗ígenos de
10 forma truncada, mantendo-se somente a sequência do DNA específica do
11 organismo de interesse (BORSUK, et al., 2011; DE SÁ, et al., 2014; SINNOTT, et al.,
12 2014). Dentre os抗ígenos totais de *N. caninum*, as proteínas de superfície NcSRS2
13 e NcSAG1, devido as características descritas anteriormente, têm sido utilizadas em
14 ensaios diagnósticos, nas suas formas recombinantes, na busca de um teste
15 específico para *N. caninum* (WILKOWSKY, et al., 2011; DONG et al., 2013;
16 PINHEIRO et al., 2013; DE SÁ et al., 2014).

17 Os ELISAs são aplicados no diagnóstico de doenças infecciosas, devido à
18 alta sensibilidade, possibilidade de automação e rapidez no processamento de
19 amostras em larga escala (GOFF et al., 2003; HARTLEBEN et al., 2012; SINNOTT
20 et al., 2014). O ELISA indireto tem sido o formato mais utilizado para a detecção de
21 anticorpos no soro dos animais suspeitos com neosporose, já que se trata de
22 método eficaz e passível de reproduzibilidade (PINHEIRO et al., 2013; TAKASHIMA
23 et al., 2013). Neste contexto, desenvolver um ELISA indireto, associando as
24 proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, pode fornecer um nível adicional de sensibilidade e
25 especificidade, pois possibilita a detecção de animais positivos tanto na fase aguda
26 (taquizoítos), quanto na fase crônica (bradizoítos), além de minimizar os resultados
27 falsos-positivos.

28 A hipótese deste trabalho é de que o desenvolvimento de um ensaio
29 diagnóstico no formato ELISA indireto, para detecção da neosporose bovina e ovina,
30 utilizando os抗ígenos rNcSRS2 e rNcSAG1 combinados, apresente melhor
31 sensibilidade e especificidade quando comparado com o ELISA indireto utilizando as
32 mesmas proteínas de forma isolada, e com o teste referencial de IFI.

33 A tese está apresentada na forma de artigos científicos, o que a nosso ver
34 propicia uma divulgação objetiva e rápida dos resultados obtidos. No item 3 é

1 apresentado um artigo de revisão bibliográfica sobre o diagnóstico da neosporose,
2 se baseando em trabalhos publicados em periódicos disponíveis no site de busca
3 PubMed, no período de 2011 a 2016. Esse trabalho foi publicado no periódico
4 *Veterinary Parasitology*, no ano de 2017. O item descreve um manuscrito referente à
5 padronização e desenvolvimento de um ELISA indireto para o diagnóstico da
6 neosporose bovina e ovina, utilizando as proteínas NcSRS2 e NcSAG1, em suas
7 formas recombinantes (rNcSRS2 e rNcSAG1) individuais e associadas. Esse
8 trabalho será submetido para publicação no periódico *Veterinary Parasitology*.
9 Também será encaminhado para a Coordenação de Inovação Tecnológica (CIT) da
10 UFPel, um pedido de depósito de patente, descrito no ítem 5 deste documento. Os
11 artigos e patente estão formatados conforme exigência dos periódicos científicos e
12 do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), respectivamente, em que
13 foi/serão publicados.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1
2
3
4
5

6 **2 OBJETIVOS**

7

8 **2.1 Objetivo geral**

9 Desenvolver um ELISA Indireto com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, para o
10 diagnóstico da neosporose bovina e ovina.

11

12 **2.2 Objetivos específicos**

- 13 • Expressar e purificar as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1 de *N. caninum* em um
14 sistema heterólogo baseado em *E. coli*;
- 15 • Testar a antigenicidade das proteínas produzidas através de *Western blotting*,
16 frente a soros de bovinos e ovinos;
- 17 • Desenvolver e padronizar um ELISA indireto com soros de bovinos e de
18 ovinos, utilizando as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1 isoladas e associadas;
- 19 • Comparar o desempenho dos testes de ELISA desenvolvidos, com o teste
20 sorológico padrão, IFI, através de análise estatística.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

3 ARTIGO

REVIEW ON THE IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF NEOSPOROSIS (YEARS 2011-2016)

Artigo publicado no periódico *Veterinary Parasitology*, v. 239, p. 19-25, 2017.

1 **REVIEW ON THE IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF**
2 **NEOSPOROSIS (YEARS 2011 – 2016)**

3 **Francine Alves Sinnott¹, Leonardo Garcia Monte², Thaís Farias Collares², Roberta**
4 **Maraninchi Silveira², Sibele Borsuk¹**

5
6 ¹Laboratório de Imunodiagnóstico and ²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitárias,
7 Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de
8 Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

9
10
11
12 * Corresponding author (mailing address): Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitárias,
13 Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de
14 Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil - P.O. Box 354. Phone: + 55 (53) 32757350

15 E-mail: sibelevborsuk@gmail.com

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

1 **Abstract**

2 Neosporosis, caused by the apicomplexan protozoan *Neospora caninum*, is a disease which
3 affects a wide range of mammalian hosts (mainly cattle and dogs). *N. caninum* infection is
4 considered the major cause of livestock abortions worldwide, and therefore is responsible for
5 great losses in the industry. Because there are no effective treatments or vaccines, diagnosis is
6 essential for pathogen control. Studies of *N. caninum* mechanisms of pathogenesis have led to
7 the identification of new antigens, including NcSRS2, NcSAG1, Ncp40, NcSUB1, NcMIC10,
8 and NcGRAs; and a variety of molecular and immunological assays, based on these
9 molecules, have been proposed to detect *N. caninum* in tissues or serum samples. We report
10 advances achieved in the last five years in neosporosis control, based on the immunological
11 and molecular diagnostic tests.

12

13 **Keywords:** *Neospora caninum*; Immunological tests; Recombinant proteins; Molecular
14 diagnostics.

15

16 **1. Introduction**

17 *Neospora caninum* is an obligate intracellular heteroxenous protozoan belonging to the
18 phylum Apicomplexa, and it is considered a major cause of abortion in cattle worldwide
19 (Bacigalupe et al., 2013; Čobádiová et al., 2013; Benavides et al., 2014; Pereira et al., 2014;
20 Li et al., 2015). Until 1984, due to morphological and antigenic similarities, the protozoan
21 was mistakenly identified as *Toxoplasma gondii* (Bjerkas et al., 1994). However, a new genus
22 and species were proposed for the organism in 1988 (Dubey et al., 1988).

23 Canids (domestic dogs, coyotes, gray wolves and dingoes) are considered definitive hosts
24 of the parasite (Uzêda et al., 2013; Hamidinejat et al., 2015). In dogs, neosporosis causes
25 neuromuscular problems that can lead to death (Mann et al., 2016). Cattle are classified as the

1 principal intermediate hosts, with abortion being the main clinical sign. However, other
2 ruminants, horses and birds may also develop the disease, thus exhibiting, although rarely,
3 clinically characteristic signs (Martins et al., 2011; Dubey et al., 2013; Oliveira et al., 2013).

4 Since the protozoan is closely associated with domestic dogs, humans do occasionally
5 suffer from exposure; however, the disease is not considered a zoonosis (Dubey and Schares,
6 2011). Immunocompromised patients in general may become an opportunistic host of the
7 pathogen; thus, the disease emerges in this population (Oshiro et al., 2015).
8 Seroepidemiological studies are needed to clarify both the occurrence and prevalence of *N.*
9 *caninum* infection in the immunocompromised patients.

10 Tachyzoites are an active form of the *N. caninum* parasite, representing the acute phase of
11 the disease (Weston et al., 2012; Goodswen et al., 2013). Tachyzoites differentiate into
12 bradyzoites, which characterize the chronic phase of the disease (Marugán-Hernández et al.,
13 2011; Jiménez-Ruiz et al., 2012). The infective form for intermediate hosts is the oocyst,
14 which is released in feces of definitive hosts (Dubey et al., 2005; Benavides et al., 2014).
15 However, the transplacental, or vertical, route accounts for about 50–95% of infections and is
16 the main route of transmission in intermediate hosts (Cardoso et al., 2012; Bacigalupe et al.,
17 2013; Almería and López-Gatius, 2015), playing an important role in the continuation of the
18 pathology in cattle herds (Santolaria et al., 2011).

19 Diagnosis of abortion due to *N. caninum* is routinely performed via histopathology and
20 immunohistochemistry (IHC) using tissues from aborted fetuses (Uzêda et al., 2013). The
21 polymerase chain reaction (PCR) is also used for the detection of parasite-specific nucleic
22 acids in samples of brain or other tissues from aborted animals (Wilkowsky et al., 2011), as is
23 the detection of antigen-specific antibodies in samples of suspected sera (Jiménez-Ruiz et al.,
24 2012). Among serological assays, indirect fluorescence antibody test (IFAT) is considered the
25 reference technique (Dubey et al., 1988). However, IFAT requires intact tachyzoites

1 (antigen), and the test yields cross-reactions with other members of the phylum Apicomplexa,
2 such as the protozoan *T. gondii* (Dong et al., 2012). To improve the diagnostic accuracy,
3 several tests have been developed, which use specific protozoan proteins in their native and
4 recombinant forms, thus reducing the cross-reactivity with other coccidian (Borsuk et al.,
5 2011; Moraveji et al., 2012; Dong et al., 2013; Ybañez et al., 2013; De Sá et al., 2014).

6 In Brazil, recent farm studies have reported the prevalence of neosporosis of between 2.5
7 and 14.9% for beef cattle and 14.1 to 34.8% for dairy cattle, with economic losses in these
8 sectors exceeding 100 million USD per year (Reichel et al., 2013). Since no effective
9 treatment or vaccine is available to control neosporosis (Almería and López-Gatius, 2015),
10 there is an urgent need for diagnostic improvement. The use of sensitive and specific
11 diagnostic methods is an effective alternative strategy to identify and control the spread of
12 protozoa (Altbuch et al., 2012). The objective of this study was to review the studies
13 conducted over the past 5 years aiming at developing both antigen detection methods and
14 antibodies for neosporosis diagnostics.

15

16 **2. Study criteria**

17 The searches for this review were performed on the PubMed search site
18 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) by limiting the search period to the last five years
19 (2011 – 2016), and using as keywords the terms "Neosporosis", "Immunodiagnosis *Neospora*
20 *caninum*", "Detection *Neospora caninum*", "Diagnosis *Neospora caninum*", and "Molecular
21 diagnosis *Neospora caninum*". The search terms generated respective totals of 181, 20, 94,
22 182, and 14 articles. Abstracts of these articles were analyzed, and all studies with an
23 objective of developing diagnostic methods for neosporosis were included in this review. All
24 non-relevant studies found in this search were excluded (about 80 articles). Articles of more

1 than five years old, yet containing information relevant to the history of the disease, are also
2 cited in this paper.

3

4 **3. *Neospora caninum* antigens**

5 A variety of *N. caninum* antigens have been described, many of which have the potential
6 for vaccination (Jiménez-Ruiz et al., 2012; Weston et al., 2012; Uchida et al., 2013; Lv et al.,
7 2015) or as diagnostic targets (Hu et al., 2011; Hiasa et al., 2012b; Yin et al., 2012; He et al.,
8 2013; Ybañez et al., 2013; Ghalmi et al., 2014; Hamidinejat et al., 2015). Among the antigens
9 used for neosporosis diagnosis, surface proteins NcSRS2, NcSAG1, NcSAG4, and Ncp40,
10 cytoskeleton protein NCPF, dense granule proteins NcGRA2, NcGRA6, and NcGRA7, serine
11 protease NcSUB1, and microneme proteins NcMIC6 and NcMIC10 are particularly worth
12 highlighting. All of the described antigens were frequently found in the last five years in
13 studies developing new diagnostic techniques, as described in Table 1.

14 Membrane antigens, important for the survival of the parasite, are involved in recognition
15 of, adhesion to, and invasion into host cells, and stimulate immune responses (Borsuk et al.,
16 2011; Hiasa et al., 2012a; Dong et al., 2013; De Sá et al., 2014; Sinnott et al., 2014). Among
17 cell surface proteins, NcSAG1 and NcSRS2 stand out, with the NcSRS2 protein indicated for
18 the detection of antibodies in both acute and chronic phases of the disease due to its presence
19 in both bradyzoites and tachyzoites.

20

21 **4. Diagnosis of neosporosis**

22

23 **4.1. Polymerase chain reaction**

24 PCR is a very important tool for the *N. caninum* detection, with the advantages of being a
25 quick, sensitive, and specific technique. However, it still has high costs (Tramuta et al., 2011).

1 PCR can be applied for the diagnosis, sequencing, protozoan DNA quantification, and
2 identification of new hosts for the parasite (Dubey et al., 2011).

3 Several PCR formats have been applied to neosporosis diagnosis as described in Table 2,
4 such as real-time PCR (Pereira et al., 2014), nested PCR (Li et al., 2014), and multiplex PCR
5 (Tramuta et al., 2011; Reisberg et al., 2013), which can be used on aborted fetus tissue,
6 amniotic or cerebrospinal fluid, blood, feces, milk, semen, etc. (Pereira et al., 2014).

7 The PCR methods developed may be used for characterization and identification of *N.*
8 *caninum* in suspected samples. Recent studies showed that *N. caninum* has a wide genetic
9 diversifying, so differences in biological behavior could be also expected. Microsatellite–
10 DNA sequence analysis proved to be a valuable tool to study this genetic diversity
11 (Bacigalupe et al., 2013). Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSRs), are
12 highly variable loci which consist of tandemly repeated units of 1–6 base pair (bp) length,
13 present in the genome of eukaryotic and prokaryotic organisms (Campero et al., 2015b). The
14 polymorphisms in these sequences result from the gain and loss of single repeat units. Several
15 studies have been performed using microsatellite loci for genetic characterization of *N.*
16 *caninum* isolates (Brom et al., 2014; Salehi et al., 2015; Qian et al., 2016; Medina-Esparza et
17 al., 2016). *N. caninum* microsatellite amplification by nested PCR showed a higher sensitivity
18 than by conventional PCR (Bacigalupe et al., 2013)

19 DNA sequences encoding ribosomal RNA (rDNA), specifically 18S rDNA and 28S
20 rDNA, have already been widely used, as well as the 14-3-3 gene, which encodes highly
21 conserved amino acid sequences in eukaryotes. However, the internal transcribed spacer 1
22 (ITS1) region of rRNA and the Nc-5 gene are used most commonly (Table 2). The ITS1 gene
23 region has been shown to be an effective target, containing differences in nucleotide
24 sequences that allow specific parasite identification at the species level (Čobádiová et al.,
25 2013; Li et al., 2014). The Nc-5 gene, a repeated DNA sequence in the *N. caninum* genome,

1 has also been shown to be an effective target (Dubey et al., 2011; Ishigaki et al., 2012;
2 Khodakaram-Tafti et al., 2012; Silva et al., 2012; Čobádiová et al., 2013; Li et al., 2014;
3 Pereira et al., 2014).

4

5 **4.2. Serological assays**

6 *N. caninum* infection stimulates the humoral immune response of the host, allowing the
7 detection of antibodies against immunodominant antigens (Hiasa et al., 2012a) found in the *N.*
8 *caninum* tachyzoite or bradyzoite form and also allowing the determination of the acute or
9 chronic infection stage (Dubey et al., 2013).

10 *Neospora*-specific IgM antibodies can be detected after 2 weeks of infection,
11 characterizing the acute stage. However, these antibodies decrease considerably at 4 weeks
12 and are difficult to detect afterwards (Dion et al., 2011). The levels of IgG antibodies (IgG1
13 and IgG2) are low in the early days of infection; yet, they soon increase during the first few
14 weeks, indicating the chronic phase of the disease. After 6 months of primary infection, both
15 natural and experimental infections show high levels of IgG antibodies (Dubey and Schares,
16 2011; Goodswen et al., 2013).

17 Indirect diagnoses through serological testing have great advantages, such as the ability to
18 be used before animal death, allowing differentiation between stages (acute or chronic) of the
19 disease (Hiasa et al., 2012a; Takashima et al., 2013), monitor the disease and help
20 management control.

21

22 **4.2.1. Commercial kits**

23 Several serological tests for antibodies against *N. caninum* are commercially available.
24 The majority are based on the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) due to
25 its easy implementation and the possibility of analyzing multiple samples in the same assay.

1 Almost all of these kits use a tachyzoite lysate or purified native antigens for polystyrene plate
2 sensitization (Table 3). The use of native or total antigens reduces the specificity of the test
3 due to cross-reactions with other coccidian (Ybañez et al., 2013). However, the search for
4 unique *N. caninum* protein targets appears promising for the development of sensitive and
5 specific diagnostic assays.

6

7 **4.2.2. Indirect fluorescence antibody test**

8 IFAT was the first serological test described (Dubey et al., 1988) and is currently the
9 reference technique used for the diagnosis of neosporosis (Piagentini et al., 2012). However, it
10 is necessary to maintain tachyzoite-infected cell lines (Sinnott et al., 2014); this results in high
11 cost of diagnosis. Further, subjectivity makes the results directly dependent on the experience
12 of the technician, and the specificity of the test can be impaired due to the possible antibody
13 reactions with other protozoa (Risco-Castillo et al., 2011; He et al., 2013; Ybañez et al.,
14 2013). Other disadvantages of the technique include only a limited number of analyses can be
15 carried out and differences between the cutoff points used for the diagnosis (Campero et al.,
16 2015a), which vary in 1:25, 1:50 and 1: 100 (Langoni et al., 2011 Cardoso et al., 2012,
17 Minervino et al., 2012), making it difficult to compare the results presented in several studies.
18 Despite the disadvantages, IFAT remains the standard serological technique for the diagnosis
19 of neosporosis, which justifies its use in most studies carried out to determine the prevalence
20 of the disease. Among the neosporosis prevalence studies conducted in Brazil, the majority
21 have been performed to detect the disease in populations of bovine and ovine (Langoni et al.,
22 2011, Rossi et al., 2011, Machado et al., 2011, Tembue et al., 2011, Cardoso et al., 2012,
23 Piagentini et al., 2012, Magalhães et al., 2014, Paiz et al., 2015); however, the prevalence in
24 other animal species has also been reported, such as caprine, canine and swine (Machado et

1 al., 2011, Plugge et al., 2011, Tembue et al., 2011, Minervino et al., 2012, de Sousa et al.,
2 2012, Andrade et al., 2013, Langoni et al., 2013, Feitosa et al., 2014, Topazio et al., 2014,) In small ruminants (sheep and goats), the seropositivity has been associated with the
3 age, showing a higher occurrence in older animals (Tembue et al., 2011). In cattle, it is
4 associated most often with dairy farms (Goodswen et al., 2013) being also present in farms of
5 beef herds, but in a lower prevalence (Reichel et al., 2013), probably due to the type of
6 management being different between the two types of livestock.. The studies conducted in
7 different regions of Brazil have reported different seroprevalence patterns among animals of
8 the same species. In the state of Pernambuco, Tembue et al. (2011) found a neosporosis
9 prevalence of 64.2% in sheep, while in the state of São Paulo, Machado et al. (2011) found
10 seroreactivity for the disease at 8.0% in the same species. This suggests that differences may
11 occur due to variations in the regions studied, the cutoff point used in the diagnosis, the
12 history of miscarriages, and even hygiene and management.

14

15 **4.2.3. Development of new serological diagnostics for neosporosis**

16 Due to the lack of vaccines and effective treatments, the best control strategy for
17 neosporosis is diagnosis. Serological tests have the advantage of using samples such as serum
18 and milk. Still, many studies have been performed in order to improve the accuracy of the
19 tests by using specific proteins and new assay formats, which have good sensitivity and
20 specificity and also offer lower costs and shorter realization times (Ghalmi et al., 2014).

21 In order to minimize false positives, most of the work done in the last five years has used
22 specific *N. caninum* recombinant proteins (Table 4) produced in *Escherichia coli* prokaryotic
23 expression systems. However, the use of native purified tachyzoite proteins in their original
24 conformation avoids undesirable changes that can occur in heterologous expression systems
25 (Uzêda et al., 2013). Alternative expression systems have also been described, such as the

1 yeast (*Pichia pastoris*) (Pinheiro et al., 2013) or insect larvae (Dong et al., 2012, 2013, 2104),
2 which are capable of performing post-translational modifications that result in recombinant
3 proteins similar to native proteins.

4 Purification of proteins may also influence the performance of the developed tests.

5 Among the markers used for the purification of recombinant proteins, a six-histidine amino
6 acid tag is most widely used in vectors for eukaryotic and prokaryotic expression (Borsuk et
7 al., 2011; Hu et al., 2011; Hu et al., 2011; Wilkowsky et al., 2011; Moraveji et al., 2012; Yin
8 et al., 2012; Dong et al., 2012, 2013; Pinheiro et al., 2013; De Sá et al., 2014; Ghalmi et al.,
9 2014; Sinnott et al., 2014), along with the protein glutathione-S-transferase (GST) (He et al.,
10 2013; Hiasa et al., 2012a, 2012b; Jin et al., 2015; Takashima et al., 2013; Ybañez et al.,
11 2013). However, a fusion with GST can interfere with the assay performance (Borsuk et al.,
12 2011), and therefore, it is often necessary to remove GST with proteases, such as
13 enterokinase.

14 For the development of new diagnostic tools for the disease (Table 4), indirect ELISA
15 format tests are mostly used, which are both sensitive and specific. Other ELISA formats have
16 been developed to increase the accuracy of this technique, for example, competitive ELISA,
17 blocking ELISA, and capture ELISA, which use mAbs or pAbs that bind to the same epitope
18 as animal serum antibodies. Moreover, these tests do not require the use of secondary
19 antibodies, which are specific for different species, and IgM and IgG antibodies can be
20 detected in the same assay (Yin et al., 2012; De Sá et al., 2014; Dong et al., 2014; Sinnott et
21 al., 2014).

22 Other techniques also demonstrate efficiency in the diagnosis of neosporosis, however
23 they are used less frequently. Among these, to immunoblot (IB) is a reliable method with a
24 high sensitivity and specificity for antibody detection and is widely used to evaluate
25 serological assays performances (Hu et al., 2011). IB is mainly used as a confirmatory method

1 and provides additional information such as the molecular weight of the reactive antigens
2 (Ghalmi et al., 2014).

3 Most of the tests developed in the last five years detected antibodies against *N. caninum*
4 in cattle (Table 4), and only few studies focused on the diagnosis of neosporosis in other
5 species. The developed tests demonstrated a sensitivity from 60% to a maximum of 100% and
6 a specificity from 88.7% to 100%. The results obtained are satisfactory, and therefore, some
7 of the tests may overcome the disadvantages of the reference technique or become an efficient
8 screening method.

9

10 **5. Final considerations**

11 Due to the lack of vaccines or effective drugs to combat the protozoan *N. caninum*, early
12 detection of neosporosis is still the best disease control strategy. Serological diagnostic
13 methods, which use parasite-specific antigen formulations to enable screening and appropriate
14 intervention in the management of herds, are most widely studied. The use of specific
15 recombinant *N. caninum* proteins, such as cell surface proteins NcSRS2 and NcSAG1, has
16 gained wide acceptance in recent years. The problems associated with the disease and its
17 global geographic distribution have stimulated the scientific community to pursue a better
18 understanding of both the parasite and the disease. In this context, various diagnostic methods
19 have been described in order to improve the diagnostic accuracy, and many studies have
20 shown promise results, bringing new perspectives to the diagnosis of neosporosis.

21

22 **References**

23 Almería, S., López-Gatius, F., 2015. Markers related to the diagnosis and to the risk of
24 abortion in bovine neosporosis. Res. Vet. Sci. 100, 169–175.
25 doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.022

- 1 Altbuch, J.A., Schofield, M.J., Porter, C.A., Gavin, W.G., 2012. *Neospora caninum*: A
2 successful testing and eradication program in a dairy goat herd. Small Rumin. Res. 105,
3 341–344. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.02.019
- 4 Andrade, G. da S., Bruhn, F.R.P., Rocha, C.M.B.M., de Sá Guimarães, A., Gouveia, A.M.G.,
5 Guimarães, A.M., 2013. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais
6 state, Brazil. Res. Vet. Sci. 94, 584–586. doi:10.1016/j.rvsc.2012.09.026
- 7 Asmare, K., Regassa, F., Robertson, L.J., Skjerve, E., 2013. Seroprevalence of *Neospora*
8 *caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and
9 breeding cattle of Ethiopia. Vet. Parasitol. 193, 85–94. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.025
- 10 Bacigalupo, D., Basso, W., Caspe, S.G., Moré, G., Lischinsky, L., Gos, M.L., Leunda, M.,
11 Campero, L., Moore, D.P., Schares, G., Campero, C.M., Venturini, M.C., 2013.
12 *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and
13 negative experimentally inoculated pregnant dams. Parasitol. Res. 112, 2585–2592.
14 doi:10.1007/s00436-013-3424-1
- 15 Bartley, P.M., Wright, S., Sales, J., Chianini, F., Buxton, D., Innes, E.A., 2006. Long-term
16 passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in
17 vivo. Parasitology 421–432. doi:10.1017/S0031182006000539
- 18 Bartley, P.M., Wright, S.E., Zimmer, I.A., Roy, S., Kitchener, A.C., Meredith, A., Innes,
19 E.A., Katzer, F., 2013. Detection of *Neospora caninum* in wild carnivores in Great
20 Britain. Vet. Parasitol. 192, 279–283. doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.001
- 21 Benavides, J., Collantes-Fernández, E., Ferre, I., Pérez, V., Campero, C., Mota, R., Innes, E.,
22 Ortega-Mora, L.M., 2014. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what
23 is known and what is needed. Parasitology 1–18. doi:10.1017/S0031182014000638
- 24 Bień, J., Moskwa, B., Bogdaszewski, M., Cabaj, W., 2012. Detection of specific antibodies
25 anti-*Neospora caninum* in the fallow deer (*Dama dama*). Res. Vet. Sci. 92, 96–8.

- 1 doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.014
- 2 Bjerkas, I., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1994. Identification and characterization of *Neospora*
3 *caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. Clin. Diagn. Lab.
4 Immunol. 1, 214–21.
- 5 Borsuk, S., Andreotti, R., Leite, F.P.L., da Silva Pinto, L., Simionatto, S., Hartleben, C.P.,
6 Goetze, M., Oshiro, L.M., Matos, M. de F.C., Berne, M.E.A., 2011. Development of an
7 indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. Vet.
8 Parasitol. 177, 33–38. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.026
- 9 Brom, P.R.F., Regidor-Cerrillo, J., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., Guimarães,
10 M.S., da Silva, A.C. 2014. Genetic characterisation of *Neospora caninum* strains
11 from clinical samples of zebuine foetuses obtained in abattoirs in Goiás, Brazil. Vet.
12 Parasitol. 204, 3-4. doi:10.1016/j.vetpar.2014.05.011
- 13 Byrem, T.M., Bartlett, P.C., Donohue, H., Voisinet, B.D., Houseman, J.T., 2012. Performance
14 of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in
15 whole and skim milk samples. Vet. Parasitol. 190, 249–253.
16 doi:10.1016/j.vetpar.2012.06.005
- 17 Campero, L.M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D.P., Hecker,
18 Y., Campero, C.M., Schares, G., Venturini, M.C., 2015a. Evaluation and comparison of
19 serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. Rev. Argent.
20 Microbiol. 47, 295–301. doi:10.1016/j.ram.2015.07.002
- 21 Campero, L.M., Venturini, M.C., Moore, D.P., Massola, L., Lagomarsino, H., García, B.,
22 Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Pardini, L., Leunda, M.R., Schares, G., Campero, C.M.,
23 2015b. Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from
24 cattle in Argentina. Exp. Parasitol. 155, 8-12. doi:10.1016/j.exppara.2015.04.009
- 25 Cardoso, J.M.S., Amaku, M., dos Santos Araújo, A.J.U., Gennari, S.M., 2012. A longitudinal

- 1 study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. Vet. Parasitol. 187,
2 553–557. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.019
- 3 Čobádiová, A., Víchová, B., Majláthová, V., Reiterová, K., 2013. First molecular detection of
4 *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). Vet. Parasitol. 197, 346–349.
5 doi:10.1016/j.vetpar.2013.05.005
- 6 de Sá, G.L., De Borba Pacheco, D., Monte, L.G., Sinnott, F.A., Xavier, M.A., Rizzi, C.,
7 Borsuk, S., Berne, M.E.A., Andreotti, R., Hartleben, C.P., 2014. Diagnostic potential of
8 Anti-rNcp-43 polyclonal antibodies for the detection of *Neospora caninum*. Curr.
9 Microbiol. 68, 472–476. doi:10.1007/s00284-013-0499-y
- 10 de Sousa, M.E., Porto, W.J.N., de Albuquerque, P.P.F., de Souza Neto, O.L., Pinheiro Júnior,
11 J.W., Mota, R.A., 2012. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in
12 the state of Alagoas, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. veterinária 21, 287–90.
13 doi:10.1590/S1984-29612012000300019
- 14 Dion, S., Germon, S., Guiton, R., Ducournau, C., Dimier-Poisson, I., 2011. Functional
15 activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular
16 parasite *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 41, 685–695.
17 doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.008
- 18 Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Kohsaka, T., Ike, K., Park, E.Y., 2013. Development of two
19 murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and
20 application on the detection of *N. caninum*. PLoS One 8, 1–9.
21 doi:10.1371/journal.pone.0053264
- 22 Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Park, E.Y., 2014. Tracking *Neospora caninum* parasites using
23 chimera monoclonal antibodies against its surface antigen-related sequences (rNcSRS2).
24 J. Biosci. Bioeng. 117, 351–357. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.09.003
- 25 Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Park, E.Y., 2012. Development of a diagnostic method for

- 1 neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. BMC Biotechnol.
2 12, 19. doi:10.1186/1472-6750-12-19
- 3 Dubey, J.P., 2005. Neosporosis in cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 21, 473–83.
4 doi:10.1016/j.cvfa.2005.03.004
- 5 Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Verma, S.K., Kwok, O.C.H.,
6 Fetterer, R., Butler, E., Carstensen, M., 2014. Isolation of viable *Neospora caninum* from
7 brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). Vet. Parasitol. 201, 150–153.
8 doi:10.1016/j.vetpar.2013.12.032
- 9 Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum*
10 infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am.
11 Vet. Med. Assoc. 193, 1259–1263.
- 12 Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Verma, S.K., Villena,
13 I., Butler, E., Carstensen, M., 2013. Congenital transmission of *Neospora caninum* in
14 white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Vet. Parasitol. 196, 519–522.
15 doi:10.1016/j.vetpar.2013.03.004
- 16 Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok,
17 O.C.H., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for
18 *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 181, 382–387. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.018
- 19 Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2006. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in
20 Ruminants. Vet. Clin. North Am. Food Anim. 22, 645–671.
21 doi:10.1016/j.cvfa.2006.08.001
- 22 Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals-The last five years. Vet. Parasitol.
23 180, 90–108. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.031
- 24 Dubey, J.P., Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet. Parasitol. 140, 1–34.
25 doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.035

- 1 Feitosa, T.F., Vilela, V.L.R., Bezerra de Melo, L.R., De Almeida Neto, J.L., De Oliveira
2 Souto, D.V., De Moraes, D.F., Athayde, A.C.R., Azevedo, S.S., De Jesus Pena, H.F.,
3 2014. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast,
4 Brazil. Vet. Parasitol. 202, 305–309. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.015
- 5 Fernandes Pinheiro, A., Borsuk, S., Elisabeth Aires Berne, M., da Silva Pinto, L., Andreotti,
6 R., Roos, T., Couto Roloff, B., Pereira Leivas Leite, F., 2015. Use of ELISA based on
7 NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis
8 in sheep and dogs. Electron. Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal 24, 148–154.
9 doi:10.1590/S1984-29612015015
- 10 Ghalmi, F., China, B., Jenkins, M., Azzag, N., Losson, B., 2014. Comparison of different
11 serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and
12 canine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 26, 136–40. doi:10.1177/1040638713515480
- 13 González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., Mezo, M., 2011. Anti-
14 *Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle.
15 Prev. Vet. Med. 101, 58–64. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.04.019
- 16 Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., 2013. A review of the infection, genetics, and
17 evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. Infect. Genet. Evol. 13,
18 133–150. doi:10.1016/j.meegid.2012.08.012
- 19 Hamidinejat, H., Seifi Abad Shapouri, M.R., Namavari, M.M., Shayan, P., Kefayat, M., 2015.
20 Development of an indirect ELISA using different fragments of recombinant Ncgra7 for
21 detection of neospora caninum infection in cattle and water buffalo. Iran. J. Parasitol. 10,
22 69–77.
- 23 He, P., Li, J., Gong, P., Liu, C., Zhang, G., Yang, J., Tuo, W., Yang, B., Zhang, X., 2013.
24 *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattle
25 neosporosis. Parasitol. Res. 112, 2117–2120. doi:10.1007/s00436-013-3309-3

- 1 Hiasa, J., Kohara, J., Nishimura, M., Xuan, X., Tokimitsu, H., Nishikawa, Y., 2012a. ELISAs
2 based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum*
3 activation. Vet. Parasitol. 187, 379–385. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.036
- 4 Hiasa, J., Nishimura, M., Itamoto, K., Xuan, X., Inokuma, H., Nishikawa, Y., 2012b.
5 Enzyme-linked immunosorbent assays based on *Neospora caninum* dense granule
6 protein 7 and profilin for estimating the stage of neosporosis. Clin. Vaccine Immunol.
7 19, 411–417. doi:10.1128/CVI.05669-11
- 8 Hu, J., Ferroglio, E., Trisciuoglio, A., 2011. Immunoblot diagnosis of infection with
9 *Neospora caninum* in cattle based on recombinant NcSAG4 Antigen. Parasitol. Res. 108,
10 1055–1058. doi:10.1007/s00436-011-2286-7
- 11 Ishigaki, K., Noya, M., Kagawa, Y., Ike, K., Orima, H., Imai, S., 2012. Detection of *Neospora*
12 *caninum*-specific DNA from cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction in a Dog
13 with confirmed neosporosis. J. Vet. Med. Sci. 74, 1051–1055. doi:10.1292/jvms.11-0341
- 14 Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., Aguado-Martínez, A., Salman, H., Irache, J.M.,
15 Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., 2012. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4,
16 NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-e{open}-caprolactone against *Neospora*
17 *caninum* infection in mice. Vaccine 30, 4983–4992. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.033
- 18 Jin, C., Yu, L., Wang, Y., Hu, S., Zhang, S., 2015. Evaluation of *Neospora caninum* truncated
19 dense granule protein 2 for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay in
20 dogs. Exp. Parasitol. 157, 88–91. doi:10.1016/j.exppara.2015.07.003
- 21 Kefayat, M., Hamidinejat, H., Seifiabadshapoori, M.R., Namavari, M.M., Shayan, P.,
22 Gooraninejad, S., 2012. Cloning and expression of *Neospora caninum* dense-granule 7 in
23 E. coli. J. Parasit. Dis. 38, 196–200. doi:10.1007/s12639-012-0221-1
- 24 Khodakaram-Tafti, A., Mansourian, M., Namavari, M., Hosseini, A., 2012.
25 Immunohistochemical and polymerase chain reaction studies in *Neospora caninum*

- 1 experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. *Vet. Parasitol.* 188, 10–13.
2 doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.013
- 3 Langoni, H., Fornazari, F., da Silva, R.C., Monti, E.T., Villa, F.B., 2013. Prevalence of
4 antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. *Braz. J.*
5 *Microbiol.* 44, 1327–30. doi:10.1590/S1517-83822013000400043
- 6 Langoni, H., Greca, H., Guimarães, F.F., Ullmann, L.S., Gaio, F.C., Uehara, R.S., Rosa,
7 E.P., Amorim, R.M., Da Silva, R.C., 2011. Serological profile of *Toxoplasma gondii* and
8 *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. *Vet.*
9 *Parasitol.* 177, 50–54. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.024
- 10 Langoni, H., Matteucci, G., Medici, B., Camossi, L.G., Richini-Pereira, V.B., Silva, R.C. Da,
11 2012. Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*
12 from dogs with neurological disorders. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 365–368.
13 doi:10.1590/S0037-86822012000300016
- 14 Li, J., He, P., Yu, Y., Du, L., Gong, P., Zhang, G., Zhang, X., 2014. Detection of *Neospora*
15 *caninum*-DNA in feces collected from dogs in Shenyang (China) and ITS1 phylogenetic
16 analysis. *Vet. Parasitol.* 205, 361–364. doi:10.1016/j.vetpar.2014.06.036
- 17 Li, W., Liu, J., Wang, J., Fu, Y., Nan, H., Liu, Q., 2015. Identification and characterization of
18 a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 2893–2902.
19 doi:10.1007/s00436-015-4490-3
- 20 Lv, Q., Xing, S., Gong, P., Chang, L., Bian, Z., Wang, L., Zhang, X., Li, J., 2015. A 78 kDa
21 host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. *Exp.*
22 *Parasitol.* 148, 56–65. doi:10.1016/j.exppara.2014.10.006
- 23 Machado, G.P., Kikuti, M., Langoni, H., Paes, A.C., 2011. Seroprevalence and risk factors
24 associated with neosporosis in sheep and dogs from farms. *Vet. Parasitol.* 182, 356–358.
25 doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.021

- 1 Magalhães, V.C.S. de, Oliveira, U.V. de, Costa, S.C.L., Santos, I. dos A., Pereira, M.J.S.,
2 Munhoz, A.D., 2014. Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of
3 crossbred cattle in the northeast of Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 257–264.
4 doi:10.1016/j.vetpar.2014.01.018
- 5 Mann, T.R., Cadore, G.C., Camillo, G., Vogel, F.S.F., Schmidt, C., Andrade, C.M., 2016.
6 Canine cutaneous neosporosis in Brazil 195–197. doi:10.1111/vde.12294
- 7 Martins, J., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P., 2011. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-
8 range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Vet. Parasitol.* 182, 349–351.
9 doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.023
- 10 Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., Aguado-Martínez, a, Alvarez-García, G., 2011.
11 Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoite-specific protein
12 NcSAG4 in tachyzoites. *Parasitology* 138, 472–80. doi:10.1017/S0031182010001666
- 13 Medina-Esparza L, Regidor-Cerrillo J, García-Ramos D, Álvarez-García G, Benavides J,
14 Ortega-Mora LM, Cruz-Vázquez C., 2016. Genetic characterization of *Neospora*
15 *caninum* from aborted bovine foetuses in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 228,
16 183–187. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.009.
- 17 Minervino, A.H.H., Cassinelli, A.B.M., de Lima, J.T.R., Soares, H.S., Malheiros, A.F.,
18 Marcili, A., Gennari, S.M., 2012. Prevalence of anti- *Neospora caninum* and anti-
19 *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from two different indigenous communities in the
20 Brazilian Amazon Region. *J. Parasitol.* 98, 1276–1278. doi:10.1645/GE-3151.1
- 21 Moraveji, M., Hosseini, A., Moghaddar, N., Namavari, M.M., Eskandari, M.H., 2012.
22 Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid
23 detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet. Parasitol.* 189, 211–217.
24 doi:10.1016/j.vetpar.2012.04.010
- 25 Nascimento, C.O.M., Silva, M.L.C.R., Kim, P.C.P., Gomes, A.A.B., Gomes, A.L. V, Maia,

- 1 R.C.C., Almeida, J.C., Mota, R.A., 2015. Occurrence of *Neospora caninum* and
2 *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in
3 Brazil. Acta Trop. 146, 60–65. doi:10.1016/j.actatropica.2015.02.016
- 4 Oliveira, U.V. de, de Magalhães, V.C.S., Almeida, C.P., Santos, I. dos A., Mota, D.A.,
5 Macêdo, L.S., Silva, F.L., Carvalho, F. dos S., Wenceslau, A.A., Munhoz, A.D., 2013.
6 Quails are resistant to infection with *Neospora caninum* tachyzoites. Vet. Parasitol. 198,
7 209–213. doi:10.1016/j.vetpar.2013.08.009
- 8 Oshiro, L.M., Motta-Castro, A.R.C., Freitas, S.Z., Cunha, R.C., Dittrich, R.L., Meirelles,
9 A.C.F., Andreotti, R., 2015. *Neospora caninum* and toxoplasma gondii serodiagnosis in
10 human immunodeficiency virus carriers. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 48, 568–572.
11 doi:10.1590/0037-8682-0151-2015
- 12 Paiz, L.M., da Silva, R.C., Menozzi, B.D., Langoni, H., 2015. Antibodies to *Neospora*
13 *caninum* in sheep from slaughterhouses in the state of São Paulo, Brazil. Rev. Bras.
14 Parasitol. veterinária = Brazilian J. Vet. Parasitol. Órgão Of. do Colégio Bras. Parasitol.
15 Veterinária 24, 95–100. doi:10.1590/S1984-29612015009
- 16 Pereira, G.R., Vogel, F.S.F., Bohrer, R.C., da Nóbrega, J.E., Ilha, G.F., da Rosa, P.R.A.,
17 Glanzner, W.G., Camillo, G., Braunig, P., de Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2014.
18 *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally
19 infected pregnant heifers. Vet. Parasitol. 199, 129–135. doi:10.1016/j.vetpar.2013.10.018
- 20 Piagentini, M., Moya-Araujo, C.F., Prestes, N.C., Sartor, I.F., 2012. *Neospora caninum*
21 infection dynamics in dairy cattle. Parasitol. Res. 111, 717–721. doi:10.1007/s00436-
22 012-2891-0
- 23 Pinheiro, A.F., Borsuk, S., Berne, M.E.A., Pinto, L.D.S., Andreotti, R., Roos, T., Roloff, B.C.,
24 Leite, F.P.L., 2013. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia*
25 *pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. Pathog. Glob.

- 1 Health 107, 116–21. doi:10.1179/2047773213Y.0000000082
- 2 Plugge, N.F., Ferreira, F.M., Richartz, R.R.T.D.B., Siqueira, A. De, Dittrich, R.L., 2011.
- 3 Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs
- 4 with neurological signs. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 20, 202–206.
- 5 doi:10.1590/S1984-29612011000300004
- 6 Pruvot, M., Hutchins, W., Orsel, K., 2014. Statistical evaluation of a commercial *Neospora*
- 7 *caninum* competitive ELISA in the absence of a gold standard: Application to wild elk
- 8 (*Cervus elaphus*) in Alberta. Parasitol. Res. 113, 2899–2905. doi:10.1007/s00436-014-
- 9 3951-4
- 10 Qian W, Wang T, Yan W, Han L, Zhai K, Duan B, Lv C.. 2016. Occurrence and first
- 11 multilocus microsatellite genotyping of *Neospora caninum* from naturally infected dogs
- 12 in dairy farms in Henan, Central China. Parasitol. Res. 115, 3267–73.
- 13 doi:10.1007/s00436-016-5142-y.
- 14 Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L.F.P., Ellis, J.T., 2013. What is
- 15 the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question.
- 16 Int. J. Parasitol. 43, 133–142. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.022
- 17 Reisberg, K., Selim, A.M., Gaede, W., 2013. Simultaneous detection of *Chlamydia spp.*,
- 18 *Coxiella burnetii*, and *Neospora caninum* in abortion material of ruminants by multiplex
- 19 real-time polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 25, 614–9.
- 20 doi:10.1177/1040638713497483
- 21 Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., Fernández-García, a., Aguado-Martínez, a.,
- 22 Jiménez-Ruiz, E., Rodríguez-Marco, S., Álvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., 2011.
- 23 Identification of a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in
- 24 *Neospora caninum* and characterization of the novel SRS9 gene. Parasitology 138,
- 25 1832–1842. doi:10.1017/S0031182011001351

- 1 Roelandt, S., Van der Stede, Y., Czaplicki, G., Van Loo, H., Van Driessche, E., Dewulf, J.,
2 Hooyberghs, J., Faes, C., 2015. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a Bayesian
3 evaluation of two antibody ELISA tests for in vivo diagnosis in purchased and abortion
4 cattle. *Vet. Rec.* 1–9. doi:10.1136/vr.102872
- 5 Rossi, G.F., Cabral, D.D., Ribeiro, D.P., Pajuaba, A.C.A.M., Corrêa, R.R., Moreira, R.Q.,
6 Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., Silva, D.A.O., 2011. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and
7 *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by
8 different serological methods. *Vet. Parasitol.* 175, 252–259.
9 doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.017
- 10 Salehi N, Gottstein B, Haddadzadeh HR., 2015. Genetic diversity of bovine *Neospora*
11 *caninum* determined by microsatellite markers. *Parasitol. Int.* 64, 357–61. doi:
12 10.1016/j.parint.2015.05.005.
- 13 Sanhueza, J.M., Heuer, C., West, D., 2013. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum*
14 and bovine viral diarrhea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev. Vet.*
15 *Med.* 112, 90–98. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.009
- 16 Santolaria, P., Almería, S., Martínez-Bello, D., Nogareda, C., Mezo, M., Gonzalez-Warleta,
17 M., Castro-Hermida, J.A., Pabón, M., Yániz, J.L., López-Gatius, F., 2011. Different
18 humoral mechanisms against *Neospora caninum* infection in purebreed and crossbreed
19 beef/dairy cattle pregnancies. *Vet. Parasitol.* 178, 70–76.
20 doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.018
- 21 Selahi, F., Namavari, M., Hosseini, M.H., Mansourian, M., Tahamtan, Y., 2013. Development
22 of a disperse dye immunoassay technique for detection of antibodies against *Neospora*
23 *caninum* in cattle. *Korean J. Parasitol.* 51, 129–132. doi:10.3347/kjp.2013.51.1.129
- 24 Silva, A.F., Rangel, L., Ortiz, C.G., Morales, E., Zanella, E.L., Castillo-Velázquez, U.,
25 Gutierrez, C.G., 2012. Increased incidence of DNA amplification in follicular than in

1 uterine and blood samples indicates possible tropism of *Neospora caninum* to the ovarian
2 follicle. Vet. Parasitol. 188, 175–178. doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.013

3 Sinnott, F.A., Monte, L.G., Collares, T.F., De Matos, B.M., Pacheco, D.B., Borsuk, S.,
4 Andreotti, R., Hartleben, C.P., 2014. Blocking elisa using recombinant ncsrs2 protein for
5 diagnosing bovine neosporosis. Curr. Microbiol. 70, 429–432. doi:10.1007/s00284-014-
6 0737-y

7 Syed-Hussain, S.S., Howe, L., Pomroy, W.E., West, D.M., Smith, S.L., Williamson, N.B.,
8 2014. Adaptation of a commercial ELISA to determine the IgG avidity in sheep
9 experimentally and naturally infected with *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 203, 21–
10 28. doi:10.1016/j.vetpar.2014.01.003

11 Takashima, Y., Takasu, M., Yanagimoto, I., Hattori, N., Batanova, T., Nishikawa, Y., Kitoh,
12 K., 2013. Prevalence and Dynamics of Antibodies against NcSAG1 and NcGRA7
13 Antigens of *Neospora caninum* in Cattle during the Gestation Period. J. Vet. Med. Sci.
14 75, 1413–1418. doi:10.1292/jvms.13-0198

15 Tembue, A.A.S.M., Ramos, R.A.D.N., Sousa, T.R. De, Albuquerque, A.R., Costa, A.J. Da,
16 Meunier, I.M.J., Faustino, M.A.D.G., Alves, L.C., 2011. Serological survey of *Neospora*
17 *caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol.
18 Veterinária 20, 246–248. doi:10.1590/S1984-29612011000300013

19 Topazio, J.P., Weber, A., Camillo, G., Vogel, F.F., Machado, G., Ribeiro, A., Moura, A.B.,
20 Lopes, L.S., Tonin, A.A., Soldá, N.M., Bräunig, P., Silva, A.S., 2014. Seroprevalence
21 and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. Rev Bras
22 Parasitol Vet 23, 360–366. doi:10.1590/S1984-29612014062

23 Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Goria, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati,
24 S., 2011. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays
25 for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. J. Vet.

- 1 Diagn. Invest. 23, 657–64. doi:10.1177/1040638711407880
- 2 Uchida, M., Nagashima, K., Akatsuka, Y., Murakami, T., Ito, A., Imai, S., Ike, K., 2013.
- 3 Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite antigens,
- 4 NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic
- 5 infection. Parasitol. Res. 112, 655–663. doi:10.1007/s00436-012-3182-5
- 6 Uzêda, R.S., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., Madruga, C.R., Aguado-Martinez, A.,
- 7 Corbellini, L.G., Driemeier, D., Gondim, L.F.P., 2013. Combination of monoclonal
- 8 antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. Vet.
- 9 Parasitol. 197, 477–486. doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.008
- 10 Varaschin, M.S., Hirsch, C., Wouters, F., Nakagaki, K.Y., Guimarães, A.M., Santos, D.S.,
- 11 Bezerra, P.S., Costa, R.C., Peconick, A.P., Langohr, I.M., 2012. Congenital neosporosis
- 12 in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. Korean J. Parasitol. 50, 63–67.
- 13 doi:10.3347/kjp.2012.50.1.63
- 14 Weston, J., Heuer, C., Parkinson, T., Williamson, N., 2012. Causes of abortion on New
- 15 Zealand dairy farms with a history of abortion associated with *Neospora caninum*. N. Z.
- 16 Vet. J. 60, 27–34. doi:10.1080/00480169.2011.631171
- 17 Weston, J.F., Heuer, C., Williamson, N.B., 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed
- 18 tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. Prev.
- 19 Vet. Med. 103, 136–144. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.08.010
- 20 Wilkowsky, S.E., Bareiro, G.G., Mon, M.L., Moore, D.P., Caspe, G., Campero, C.M., Fort,
- 21 M., Romano, M.I., 2011. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1
- 22 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. J. Vet. Diag. Invest. 23, 971–
- 23 976. doi:10.1177/1040638711416845
- 24 Ybañez, R.H.D., Terkawi, M.A., Kameyama, K., Xuan, X., Nishikawa, Y., 2013.
- 25 Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for

1 serodiagnosis of *Neospora caninum* infection. Clin. Vaccine Immunol. 20, 1617–1622.
2 doi:10.1128/CVI.00352-13
3 Yin, J., Qu, G., Cao, L., Li, Q., Fetterer, R., Feng, X., Liu, Q., Wang, G., Qi, D., Zhang, X.,
4 Miramontes, E., Jenkins, M., Zhang, N., Tuo, W., 2012. Characterization of *Neospora*
5 *caninum* microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnostic marker
6 for neosporosis. Vet. Parasitol. 187, 28–35. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.003
7

8 **Tables title**

9

10 **Table 1**

11 The antigens that are most commonly used to develop diagnostics for neosporosis.

12

13 **Table 2**

14 PCR based methods used for detection of the parasite *N. caninum* in different animal species.

15

16 **Table 3**

17 The commercial tests that are cited for neosporosis diagnosis during the last five years.

18

19 **Table 4**

20 Serological assays developed for antibodies against *N. caninum*.

21

22

23

24

25

26

1 **Table 1**

2 The antigens that are most commonly used to develop diagnostics for neosporosis.

Antigen	<i>N. caninum</i> Localization	Tachyzoite – T Bradyzoite – B	Reference
NcSRS2	Cellular surface	T e B	(Sinnott et al., 2014; Dong et al., 2014; De Sá et al., 2014; Pinheiro et al., 2013; Uzêda et al., 2013; Dong et al., 2012; Borsuk et al., 2011; Fernandes Pinheiro et al., 2015)
NcSAG1	Cellular surface and dense granule	T	(Takashima et al., 2013; Dong et al., 2013; Dong et al., 2012; Hiasa et al., 2012a; Moraveji et al., 2012; Wilkowsky et al., 2011)
NcSAG4	Cellular surface	B	(Hu et al., 2011)
Ncp40	Cellular surface	*	(He et al., 2013)
NcPF	Cytoskeleton	*	(Hiasa et al., 2012b)
NcGRA2	Dense granule	T e B	(Dong et al., 2012);
NcGRA6	Dense granule	*	(Ghalmi et al., 2014)
NcGRA7	Dense granule	T e B	(Takashima et al., 2013; Uzêda et al., 2013; Hiasa et al., 2012a; Hamidinejat et al., 2015; Kefayat et al., 2012)
NcSUB1	Serine protease	T	(Ybañez et al., 2013)
NcMIC10	Microneme	T	(Yin et al., 2012)
NcMIC6	Microneme	T	(Li et al., 2015)

3 * Location not described.

4

5

6

7

8

9

10

11

1 **Table 2**2 PCR based methods used for detection of the parasite *N. caninum* in different animal species

DNA target	Type of PCR	Host	Sample	Reference
Gene Nc-5	One-Step PCR	Fox	Brain	(Nascimento et al., 2015)
Gene Nc-5 ITS1	Two-Step Nested PCR; One-Step PCR	Dog	Feces	(Li et al., 2014)
Gene Nc-5	One-Step PCR	Wolf	Cell culture	(Dubey et al., 2014)
Gene Nc-5	Real Time PCR (TaqMan)	Sheep	Fetal tissues	(Pereira et al., 2014)
Gene Nc-5 ITS1	One-Step PCR; Two-Step Nested PCR	European brown bear	Muscle, liver, spleen	(Čobádiová et al., 2013)
ITS1	Nested PCR	Ferret, fox, badger	Brain and other tissues	(Bartley et al., 2013)
Gene Nc-5	Two-Step semi- Nested PCR	Dog	Cerebrospinal fluid	(Ishigaki et al., 2012)
Gene Nc-5	Multiplex PCR Nested PCR	Dog	Brain	(Langoni et al., 2012)
ITS1	One-Step PCR	Goat	Placenta	(Varaschin et al., 2012)
Gene Nc-5	One-Step PCR	Chicken	Lung, heart, brain, joints and chorioallantoic membrane	(Khodakaram-Tafti et al., 2012)
Gene Nc-5	One-Step PCR	Ox	Uterus and blood	(Silva et al., 2012)
Gene Nc-5	Two-Step Nested PCR	Wolf	Feces	(Dubey et al., 2011)

3

4

5

6

7

8

9

10

1 **Table 3**

2 The commercial tests that are cited for neosporosis diagnosis during the last five years.

Test	Format	Antigen	Manufacturer	Reference
IDEXX <i>Neospora</i> X2 Ab test kit	ELISA Indirect	Not informed	IDEXX Laboratories	(Asmare et al., 2013); (Wilkowsky et al., 2011)
IDEXX <i>Neospora</i> Ab test kit	ELISA Indirect	Not informed	IDEXX Laboratories	(Byrem et al., 2012); (Bieñ et al., 2012)
CHEKIT <i>Neospora</i> antibody test kit	ELISA Indirect	Tachyzoites lysed by detergent	IDEXX Laboratories	(Syed-Hussain et al., 2014); (Sanhueza et al., 2013)
HerdChek anti- <i>Neospora</i> IDEXX	ELISA Indirect	Tachyzoites lysed by sonication	IDEXX Laboratories	(Ghalmi et al., 2014)
<i>Neospora caninum</i> Antibody Detection Kit (BIO K 192)	ELISA Sandwich	Purified tachyzoite antigen – NcSRS2	Bio-X Diagnostics SPRL	(Ghalmi et al., 2014); (González-Warleta et al., 2011)
<i>Neospora caninum</i> ELISA Kit (BIO K 218)	ELISA Competitive	Purified tachyzoite antigen–NcSRS2	Bio-X Diagnostics SPRL	(Roelandt et al., 2015)
CIVTEST BOVIS NEOSPORA	ELISA Indirect	Tachyzoites lysed by sonication	HIPRA	(Silva et al., 2012)
SVANOVIR <i>Neospora</i> -Ab ELISA	ELISA Indirect	Antigens associated with immune stimulating complexes (ISCOM)	SVANOVA Biotech AB	(Selahi et al., 2013); (Moraveji et al., 2012)
Neospora caninum Antibody Test Kit (cELISA)	ELISA Competitive	Surface antigens captured by monoclonal antibodies	VMRD	(Pruvot et al., 2014)

3

4

5

6

7

1 **Table 4**2 Serological assays developed for antibodies against *N. caninum*.

Format	Antigen	Sensitivity-Se/ Specificity-Sp - %	Species and n° de samples	Reference
ELISA indirect	Recombinant Protein NcGRA7	Bovine: Se 94,64 Sp 90,38 Bubaline: Se 98,57 Sp 86,54	108 bovine sera and 122 Bubaline sera	(Hamidinejat et al., 2015)
ELISA indirect	Recombinant Protein NcSRS2	Ovine: Se 100 Sp 94,5 Canine: Se 100 Sp 93,3	110 ovine sera and 65 canine sera	(Fernandes Pinheiro et al., 2015)
ELISA indirect	Truncated recombinant Protein NcGRA2	**	* Experimentally infected canine sera	(Jin et al., 2015)
ELISA (blocking)	Truncated recombinant Protein NcGRA2	Se 98,7 Sp 88,7	152 bovine sera	(Sinnott et al., 2014)
Latex agglutination (LAT)	Recombinant Protein NcGRA6	Canine: Se 76 Sp 100 Bovine: Se 60 Sp 100	100 canine sera and 100 bovine sera	(Ghalmi et al., 2014)
ELISA (blocking)	Truncated recombinant Protein NcSRS2	**	24 bovine sera	(De Sá et al., 2014)
ELISA sandwich & ELISA competitive	Recombinant Protein NcSAG1	**	* Bovine sera	(Dong et al., 2013)
ELISA indirect	Recombinant Protein Ncp40	Se 98,2 Sp 98,6	682 bovine sera	(He et al., 2013)
ELISA indirect	Truncated recombinant Protein NcSRS2	Se 100 Sp 97,8	139 bovine sera	(Pinheiro et al., 2013)
ELISA indirect	Recombinant Protein NcSAG1 and NcGRA7	**	129 bovine sera	(Takashima et al., 2013)
Immunohistochemistry (IHC)	Purified Tachyzoites	**	* Bovine tissues were artificially prepared with tachyzoite culture	(Uzeda et al., 2013)
ELISA indirect	Recombinant Protein NcSUB1 (fragment NcSUB1t; fragment NcSUB1tr) ;	NcSUB1t: Se 94,59 Sp 80 NcSUB1tr: Se 95,95 Sp 100	79 cow sera with abortion history and 4 experimentally infected cow sera	(Ybañez et al., 2013)

ELISA Capture	Recombinant Protein NcMIC10	Se 90 Sp 100	10 caprine sera	(Yin et al., 2012)
Latex agglutination (LAT)	Recombinant Protein NcSAG1	**	164 bovine sera	(Moraveji et al., 2012)
ELISA indirect	Recombinant Proteins NcSRS2, NcSAG1 e NcGRA2	Se 91,7 Sp 100	32 bovine sera	(Dong et al., 2012)
ELISA indirect	Recombinant Proteins NcGRA7 e NcSAG1	**	4 experimentally infected bovine sera, and 58 cow sera with abortion history	(Hiasa et al., 2012a)
ELISA indirect	Recombinant Proteins NcGRA7 and NcPF	**	174 canine sera	(Hiasa et al., 2012b)
ELISA indirect	Truncated recombinant Protein NcSRS2	Se 95 Sp 96	497 bovine sera	(Borsuk et al., 2011)
Immunoblotting	Recombinant Protein NcSAG4	**	52 bovine sera	(Hu et al., 2011)
Antigen print immunoassay (APIA)	Recombinant Protein NcSAG1	Se 85 Sp 96	232 bovine sera	(Wilkowsky et al., 2011)

1 * Number of samples not described.

2 ** Se and Sp not described.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

4 MANUSCRITO

ASSOCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NcSRS2 E NcSAG1 DE *Neospora caninum* NO DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA INDIRETO PARA A NEOSPOROSE

Artigo a ser submetido ao periódico *Veterinary Parasitology*, após tradução para língua inglesa.

O trabalho está formatado de acordo com exigências da revista, disponíveis no link:

<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology/0304-4017?generatepdf=true>

**ASSOCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NcSRS2 E NcSAG1 DE
Neospora caninum NO DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA INDIRETO PARA A
NEOSPOROSE**

Francine Alves Sinnott¹, Karen da Silva Leal¹, Felipe Pappen², Nara Amélia da Rosa Farias³, Horwald Alexander Bedoya Llano⁴, Andrea Caetano da Silva⁵, Sibele Borsuk¹

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitárias, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico; ²Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Veterinária Preventiva; ³Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia; Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil;

⁵Laboratório de Parasitologia Veterinária, Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Saúde Pública e Patologias Tropicais, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

* Autor de correspondência (endereço para correspondência): Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil – Caixa Postal 354.

Telefone: + 55 (53) 32757350

E-mail: sibelevborsuk@gmail.com

1 **RESUMO**

2 A neosporose é considerada uma das principais causas de aborto na bovinocultura e é
3 intimamente ligada ao nascimento de cordeiros fracos na ovinocultura. O diagnóstico padrão é
4 feito através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), no entanto, reações cruzadas
5 com outros protozoários são descritas. Como estratégia para um diagnóstico mais específico,
6 antígenos recombinantes vêm sendo testados em diversos formatos de imunoensaios,
7 destacando-se as proteínas NcSAG1 (*surface antigen-1*) e NcSRS2 (*SAG1-related sequence*
8 2) como as mais estudadas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um
9 ELISA indireto com as proteínas recombinantes NcSRS2 e NcSAG1 (rNcSRS2 e rNcSAG1),
10 para o diagnóstico da neosporose bovina e ovina. Para tal, um total de 370 amostras de soros
11 foram utilizados, sendo 216 de bovinos (106 positivos e 110 negativos) e 154 de ovinos (48
12 positivos e 110 negativos), em um ELISA indireto com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1 de
13 forma isolada e em associação. Os resultados do ELISA indireto foram submetidos à análise
14 ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A sensibilidade e especificidade com a proteína
15 rNcSRS2 isolada foi de 91,5% e 96,4% para bovinos e 89,6% e 96,3% para ovinos,
16 respectivamente, e a sensibilidade e especificidade com a proteína rNcSAG1 isolada foi de
17 84,9% e 97,3% para bovinos e 89,6% e 92,6% para ovinos, respectivamente. Quando as
18 proteínas foram associadas, a sensibilidade e especificidade foram de 98,1% e 99,1% para
19 bovinos e 100% e 97,2% para ovinos, respectivamente. Os resultados obtidos, indicam que o
20 ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 é um método sensível e específico para a detecção de anticorpos
21 em populações de bovinos e ovinos, sendo uma alternativa para o diagnóstico de *N. caninum*.

22

23 **PALAVRAS CHAVES:** *Neospora caninum*; ELISA; Diagnóstico; Ncp-43; Ncp-29.

24

25

1 1. INTRODUÇÃO

2

3 *Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório, causador da doença
4 conhecida por neosporose, sendo esta uma das principais causas de abortos em bovinos no
5 mundo, tanto na bovinocultura de leite quanto de corte (Andreotti et al., 2009; Čobádiová et
6 al., 2013; Pereira et al., 2014). Os hospedeiros definitivos são os canídeos, demésticos e
7 silvestres, e uma ampla variedade de mamíferos podem se apresentar como hospedeiros
8 intermediários, destacando-se os bovinos e ovinos como os hospedeiros mais estudados
9 (Dong et al., 2012; Dubey et al., 2011; Dubey and Lindsay, 2006; Sinnott et al., 2014). A
10 neosporose bovina ocasiona abortos e mortalidade neonatal (Hiasa et al., 2012), já a
11 nesporose em ovinos ocorre com menor frequência, e está associada a infecções congênitas e
12 nascimentos de cordeiros fracos (Dubey and Lindsay, 2006; Rossi et al., 2011).

13 O diagnóstico sorológico padrão para a neosporose é a imunofluorescência indireta
14 (IFI), a qual utiliza taquizoítos intactos fixados (Andrade et al., 2013; Cardoso et al., 2012;
15 Frössling et al., 2003), sendo este o primeiro ensaio sorológico descrito para o diagnóstico da
16 doença (Dubey et al., 1988). No entanto, para sua execução se faz necessário à manutenção
17 de linhagens celulares infectadas com taquizoítos, tornando-se um diagnóstico laborioso.
18 Além disso, a subjetividade do resultado é diretamente dependente da experiência do executor
19 do teste, e sua especificidade pode ser prejudicada devido à reação de anticorpos presentes em
20 amostras positivas para outros protozoários, como por exemplo, *Toxoplasma gondii*, pois este
21 apresenta grande similaridade morfológica e compartilha muitos抗ígenos com *N. caninum*
22 (Dong et al., 2013).

23 Dentre os métodos mais utilizados em pesquisas para a detecção de anticorpos contra
24 *N. caninum*, os ensaios no formato ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), ganham
25 maior destaque por possuírem ampla aplicação no diagnóstico de doenças infecciosas, devido

1 à alta sensibilidade, possibilidade de automação e rapidez no processamento de amostras em
2 larga escala (Goff et al., 2003; Sinnott et al., 2017).

3 As proteínas de superfície NcSRS2 e NcSAG1, são antígenos imunodominantes, e
4 representam um papel fundamental no reconhecimento, adesão e invasão da célula
5 hospedeira (Borsuk et al., 2011; Hosseininejad et al., 2010). O antígeno NcSRS2 é expresso
6 em taquizoítos e bradizoítos e apresenta 44% de homologia com TgSRS2 de *T. gondii*, já o
7 antígeno NcSAG1 é um dos principais antígenos de superfície de taquizoítos e apresenta uma
8 homologia de 53% com TgSAG1, também de *T. gondii* (Dong et al., 2013; Howe et al.,
9 1998). Para evitar reações cruzadas, muitos trabalhos descrevem a utilização do gene em sua
10 forma truncada para produção de proteínas recombinantes, mantendo-se somente a sequência
11 específica do gênero *Neospora* (Borsuk et al., 2011; De Sá et al., 2014; Sinnott et al., 2014).
12 A utilização individual dessas proteínas, de forma recombinante, já foi descrita em
13 composições vacinais e em testes diagnósticos (Fernandes-Pinheiro, et al., 2018; Haldorson et
14 al., 2005; He et al., 2013; Wilkowsky et al., 2011), no entanto, a associação de proteínas
15 recombinantes poderia fornecer um nível adicional de sensibilidade e especificidade aos testes
16 de diagnóstico

17 Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um ELISA indireto,
18 associando as proteínas NcSRS2 e NcSAG1 recombinantes, para o diagnóstico da neosporose
19 bovina e ovina.

20

21 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

22

23 **2.1 Obtenção dos soros**

24 Um total de 370 amostras de soros, provenientes de fazendas localizadas na região sul
25 do Rio Grande do Sul, disponíveis no banco de soros do Laboratório de Biotecnologia

1 Infecto-parasitária, da Universidade Federal de Pelotas foram utilizadas, sendo 216 soros de
2 bovinos (106 amostras positivas e 110 amostras negativas) e 154 soros de ovinos (48 amostras
3 positivas e 106 amostras negativas). Todos os soros utilizados foram coletados de rebanhos
4 que apresentavam algum tipo de problemas reprodutivos. A soro-positividade ou negatividade
5 das amostras foi previamente confirmadas pela técnica de IFI, sendo considerados positivos
6 os soros que apresentaram títulos superiores a 1/100 em ovinos, e 1/200 em bovinos (Pare et
7 al., 1995). Também foi utilizado soro de terneiro e de cordeiro recém-nascidos, de rebanhos
8 que não apresentavam problemas reprodutivos, sendo denominados de soro normal de
9 terneiro (SNT) e soro normal de cordeiro (SNC). Os soros das progenitoras foram analisados
10 por IFI, conforme citado no parágrafo anterior, sendo a negatividade para *N. caninum*, o
11 critério para coleta do soro do terneiro e do cordeiro.

12

13 **2.2 Expressão e purificação da proteína recombinante rNcSRS2**

14 O vetor pET100/D TOPO/NcSRS2 previamente construído (Borsuk et al., 2011),
15 contendo o domínio抗原的 do gene *srs2*, foi utilizado para transformar bactérias
16 *Escherichia coli* BL21 Star (DE3). As células de *E. Coli* foram cultivadas em meio Luria
17 Bertani (LB) e na fase logarítmica ($OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,8$) foram tratadas com 1 mM isopropyl
18 α-D-thiogalactoside (IPTG) por 3 h a 37 °C para induzir a expressão da proteína NcSRS2. As
19 proteínas foram solubilizadas em tampão fosfato salino (PBS) contendo 0.2% N-lauroil
20 sarcosinato. A expressão da rNcSRS2 foi confirmada através de SDS-PAGE 12% e *Western*
21 *Blot* (WB) utilizando um anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (1:5000) (Sigma Aldrich).
22 rNcSRS2 foi purificada por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados
23 (IMAC) utilizando coluna Ni2+ Sepharose HisTrap, de acordo com as instruções do
24 fabricante (GE Healthcare). A proteína recombinante purificada foi dialisada em PBS

1 (contendo 0.1% de glicina, pH 7,4) por aproximadamente 16 h a 4 °C, em 1000x o volume da
2 amostra final.

3 As frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE 12% em condições redutoras,
4 e a concentração final foi determinada pelo método do ácido bicinconílico utilizando o kit
5 comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology) com albumina de soro
6 bovino como referência. As proteínas foram acondicionadas a -20 C° até sua utilização.
7

8 **2.3 Clonagem do gene *sag1***

9 Através de sequência disponível no Genbank (acesso AAD25091.1) um gene sintético
10 contendo códons preferenciais para expressão da proteína NcSAG1 em *E. coli* foi sintetizado
11 (Epoch Life Science). A sequência gênica codificadora *sag1* (*NcSAG1*) presente no plasmídeo
12 pBlueScript foi isolada utilizando-se as enzimas de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e *BamHI*
13 (Invitrogen) e então ligada ao vetor de expressão pAE utilizando a enzima T4 DNA ligase
14 (Invitrogen). O produto da ligação foi utilizado na transformação de *E. coli* cepa TOP 10
15 eletrocompetentes e as colônias recombinantes foram selecionadas através de uma lise rápida
16 utilizando fenol-clorofórmio, e posterior eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA do
17 plasmídeo pAE/NcSAG1, foi extraído utilizando o Kit Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen),
18 e após, foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e *BamHI* (Invitrogen),
19 para caracterização do plasmídeo recombinante.

20

21 **2.3.1 Expressão e purificação da proteína recombinante rNcSAG1**

22 Para estabelecer as condições da expressão da proteína rNcSAG1, foi realizado um
23 teste em pequena escala (10 mL). O plasmídeo construído (pAE/NcSAG1) foi utilizado para
24 transformar (choque térmico e eletroporação) as cepas de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3),
25 BL21 pLysE (DE3), BL21 pLysS (DE3), BL21 Roseta (DE3) e BL21-CodonPlus (DE3)-RP.

1 As cepas foram cultivadas individualmente em 10 mL de meio de LB, contendo, quando
2 necessário, antibiótico conforme gene para seleção individual de cada cepa, além do
3 antibiótico para seleção do vetor pAE/NcSAG1(ampicilina 100 µg/mL). Para a expressão da
4 proteína recombinante rNcSAG1, as bactérias transformadas com o vetor pAE/NcSAG1
5 foram cultivadas nas temperaturas de 30°C e 37°C. Quando o crescimento bacteriano atingiu a
6 fase logarítmica ($OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,8$), foi realizada a indução da expressão com 1 mM
7 isopropyl α -D-thiogalactoside (IPTG) durante 3 h, 4 h e 16 h, e após, o cultivo foi
8 centrifugado a $10.000 \times g$ por 5 min a 4°C. Os pellets resultantes foram eluídos em tampão TE
9 (Tris-HCl 10 mM / EDTA 1mM pH 8,0), sonicados (4 tempos de 45s, 20kHz) e submetidos à
10 SDS-PAGE 12% (corado com Comassie blue) e a um WB utilizando um anticorpo
11 monoclonal anti-6x-histidina (1:5000) (Sigma Aldrich) e anti-IgG camundongo conjugado à
12 peroxidase (1:4000) (Sigma Aldrich) como anticorpo primário e secundário, respectivamente.
13 Para testar a solubilidade da proteína, o pellet já eluído e sonicado, foi centrifugado a 10.000
14 $\times g$ por 5 min a 4°C, o resultado da centrifugação (sobrenadante e pellet) foi submetido à
15 SDS-PAGE 12%.

16 Após o estabelecimento das condições ideais para expressão da proteína rNcSAG1,
17 realizou-se a expressão em maior volume. A cepa que apresentou expressão da proteína
18 rNcSAG1 foi cultivada em 500 mL de meio de cultura LB. Quando o crescimento bacteriano
19 atingiu a fase logarítmica ($OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,8$), foi realizada a indução da expressão com 1
20 mM isopropyl α -D-thiogalactoside (IPTG), e após o tempo de indução estabelecido,
21 centrifugação a $10.000 \times g$ por 15 min a 4°C. O pellet resultante foi suspenso em tampão
22 PBS a 4 °C, acrescido de Lisozima 100 mM e sonicado (4 tempos de 45 s, 20 kHz). Após
23 centrifugação sob as mesmas condições anteriores, o pellet foi suspenso em tampão
24 contendo 0,2% de N-lauroil sarcosinato, por 16 h, a 4°C. O cultivo foi centrifugado por 1 h e
25 30 min, a $10.000 \times g$ a 4°C. A porção contendo a proteína foi coletada, filtrada em membrana

1 0,8 µM (Milipore) e utilizada para a purificação. A purificação da proteína rNcSAG1 foi
2 realizada conforme descrito para a proteína rNcSRS2. A proteína rNcSAG1 foi eluída em
3 diferentes molaridades de imidazol e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e
4 a um WB utilizando um anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (1:5000) (Sigma Aldrich).
5 A fração contendo a proteína rNcSAG1 foi então dialisada com tampão PBS (contendo 0.1%
6 de glicina, pH 7,4) por aproximadamente 16 h a 4 °C, em 1000x o volume da amostra final,
7 quantificada utilizando o Kit BCA (descrito anteriormente) e armazenada para utilização
8 posterior.

9

10 **2.4 Teste de antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1**

11 As duas proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1 foram testadas, através de
12 WB, quanto a capacidade de serem reconhecidas por soros de animais naturalmente
13 infectados. Um SDS-PAGE 12% foi realizado, com 5 µg das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1
14 por cavidade. As proteínas foram eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose (GE
15 Healthcare) e bloqueadas com PBS contendo 5% de leite desnatado. As membranas foram
16 lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20% (PBS-T) e após, foi adicionado um pool de
17 soros positivos (10 soros) e negativos (10 soros) para *N. caninum* (caracterizados pela IFI),
18 em uma diluição 1:100, de ovinos e de bovinos. Como controle, foi utilizado soro de bovino
19 positivo para *T. gondii* (1:100) e anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (1:5000) (Sigma
20 Aldrich). Após incubação, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG bovino
21 conjugado à peroxidase (1:4000) (Sigma-Aldrich), anti-IgG ovino conjugado à peroxidase
22 (1:4000) (Sigma-Aldrich) e anti-IgG camundongo conjugado à peroxidase (1:4000) (Sigma
23 Aldrich), , diluídos em PBS-T. A reatividade foi revelada utilizando 3,3'-Diaminobenzidina
24 (DAB) e H₂O₂.

25

1 **2.5 Desenvolvimento do Elisa indireto**

2 Microplacas de poliestireno de 96 poços (Polysorp Nunc) foram sensibilizadas com as
3 proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, individualmente, contendo 100 ng de cada proteína por poço,
4 e em associação, contendo 50 ng de cada proteína por poço, padronizadas anteriormente
5 (dados não mostrados), por 16 h, a 4 °C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e
6 armazenadas a temperatura de – 20 °C até sua utilização. O bloqueio das placas foi feito com
7 PBS-T acrescido de 1% de Soro Fetal Bovino (SFB), por 2 h a 37 °C e após, as placas foram
8 lavadas 5 vezes com PBS-T. Os soros positivos e negativos, de bovinos e ovinos, foram
9 adicionados separadamente, diluídos 1:100 em PBS-T+1% de SFB, por 1 h a 37 °C. Como
10 controles negativos, utilizamos SNT e SNC. Todos os soros foram testados em duplicatas.

11 Após a incubação e posterior lavagens, foi adicionado a placa o anticorpo secundário anti-IgG
12 bovino conjugado com peroxidase (1:4000) (Sigma-Aldrich) e o anticorpo secundário anti-
13 IgG ovino conjugado com peroxidase (1:4000) (Sigma-Aldrich), diluídos em PBS-T+1% de
14 SFB, por 1 h a 37 °C. Para a reação colorimétrica uma solução contendo 0,01 g de
15 ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) diluído em 10 mL de tampão citrato-fosfato
16 pH=4,0 e 50 µL de H₂O₂, foi adicionado a placa. Após a interrupção da reação com H₂SO₄ 4
17 N, a absorbância foi determinada numa faixa de comprimento de onda entre 450 e 492 nm em
18 leitor de microplaca (Microplate reader MR-96A, Mindray).

19

20 **2.6 Análise estatística**

21 Para avaliar a especificidade, sensibilidade, acurácia, ponto de corte e valores
22 preditivos do teste ELISA indireto, os resultados obtidos com os 370 soros foram submetidos
23 à análise ROC (Receiver Operating Characteristic) utilizando o software MedCalc estatística
24 (versão 10.3.0). A avaliação foi realizada com o teste das proteínas individuais e associadas,
25 para as duas espécies testadas, comparando seus resultados com o teste padrão (IFI).

1 **3. RESULTADOS**

2

3 **3.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1**

4 A proteína rNcSRS2 foi expressa por *Escherichia coli* cepa BL21 Star (DE3) como
5 corpos de inclusão, sendo solubilizada em 0,2% de N-lauroil sarcosinato. O peso molecular da
6 proteína foi de aproximadamente 30 kDa e o rendimento médio obtido foi de 1 mg/L.

7 A proteína rNcSAG1 foi clonada com sucesso e expressa no tamanho molecular de
8 ≈30 kDa. De todas as cepas de *E. coli* testadas [BL21 Star (DE3), BL21 pLysE (DE3), BL21
9 pLysS (DE3), BL21 Roseta (DE3) e BL21-CodonPlus (DE3)-RP], a proteína rNcSAG1 foi
10 expressa somente pela cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP (dados não mostrados), como corpos
11 de inclusão, sendo solubilizada em 0,2% de N-lauroil sarcosinato. Obtendo-se melhores
12 resultados após 3 horas de indução, a temperatura de 37 °C.

13 A proteína rNcSAG1 foi purificada e um rendimento médio de 1 mg/L foi obtido.

14

15 **3.2 Teste de antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1**

16 As proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1 foram consideradas antigênicas,
17 uma vez que os anticorpos presentes nos soros dos animais positivos para neosporose
18 (bovinos e ovinos), confirmados por IFI, foram capazes de reconhecer as proteínas através de
19 WB (Figura 1). As reações representam o tamanho esperado das duas proteínas (≈30 kDa). O
20 soro bovino positivo para *T. gondii* utilizado, não apresentou reação frente às duas proteínas
21 (Figura 1), podendo-se concluir que ambas, nas suas formas truncadas, são específicas do
22 protozoário *Neospora sp..*

23

24

25

1 **3.3 ELISA Indireto**

2 Os 216 soros de bovinos (106 positivos e 110 negativos) e 154 soros de ovinos (48
3 positivos e 106 negativos), previamente estabelecidos pela IFI, foram avaliados por ELISA
4 indireto. O ELISA rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSRS2/rNcSAG1 foi caracterizado e os
5 resultados de cada um dos ELISA foram correlacionados com a IFI, utilizando a análise ROC.
6 Os valores dos pontos de corte para bovinos foram de >0,59 para rNcSRS2, >0,64 para
7 rNcSAG1 e >0,41 para rNcSAG1/rNcSRS2 (Figura 2), dos 106 soros positivos, 9, 16 e 2
8 estavam abaixo do ponto de corte estabelecido e dos 110 soros negativos, 4, 3 e 1 estavam
9 acima do ponto de corte, quando avaliado pelo ELISA rNcSRS2, rNcSAG1 e
10 rNcSRS2/rNcSAG1, respectivamente. O ponto de corte para ovinos foram de >0,253 para
11 rNcSRS2, >0,23 para rNcSAG1 e >0,20 para rNcSAG1/rNcSRS2 (Figura 3), dos 48 soros
12 positivos, 5 estavam abaixo do ponto de corte, quando avaliado pelo ELISA rNcSRS2 e
13 rNcSAG1, no entanto nenhum soro foi considerado negativo quando avaliado pelo ELISA
14 rNcSRS2/rNcSAG1, e dos 106 soros negativos, 4, 8 e 3 estavam acima do ponto de corte
15 estabelecido, quando avaliado pelo ELISA rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSRS2/rNcSAG1,
16 respectivamente. Sendo possível observar através dos dados obtidos, que o ELISA com as
17 proteínas associadas (Figuras 2C e 3C), apresentou resultados mais precisos, quando
18 comparado com o ELISA com as proteínas isoladas (Figuras 2A e B, 3A e B). O SNT e o
19 SNC não reconheceram as proteínas no ELISA indireto (dados não mostrados).

20

21 **3.4 Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo**

22 O ELISA rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSAG1/rNcSRS2 mostraram 91,5%, 84,9% e
23 98,1% de sensibilidade e, 96,4%, 97,3% e 99,1% de especificidade, respectivamente. O
24 ELISA rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSAG1/rNcSRS2 mostraram 89,6%, 89,6% e 100% de
25 sensibilidade e, 96,3%, 92,6% e 97,2% de especificidade, respectivamente. A área sob a curva

1 foi usada para determinar a acurácia dos imunoensaios, obtendo-se como resultados para
2 bovinos (Figura 4) os valores de 0,930, 0,901 e 0,981 e para ovinos (Figura 5) os valores
3 0,916, 0,897 e 0,999 para rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSRS2/rNcSAG1, respectivamente, para
4 os dois testes. Os valores preditivos negativos e positivos do ensaio com as proteínas
5 associadas variaram de 85,2% a 99,7% e de 92,3% a 99,8% respectivamente para bovinos
6 (Figura 6A). Para ovinos (Figura 6B), os valores preditivos positivos variaram de 79,8% a
7 99,6% e não houve variação dos negativos, uma vez que 100% dos soros foram compatíveis
8 com o resultado da IFI. Os valores preditivos obtidos dependem da prevalência da neosporose
9 exibida em uma área específica.

10

11 4. DISCUSSÃO

12 A neosporose é uma das principais causas de abortos na bovinocultura em todo o
13 mundo, sendo responsável por causar grandes perdas econômicas nessas populações. Todavia
14 sua relevância clínica, econômica e epidemiológica em pequenos ruminantes, nos quais
15 incluem-se os ovinos, não é inteiramente compreendida (Filho et al., 2017).

16 Em virtude da problemática do diagnóstico, desenvolvemos em nosso trabalho um
17 teste sorológico utilizando antígenos recombinantes e específicos de *Neospora sp.*, para
18 detecção de anticorpos anti-NcSRS2 e anti-NcSAG1, presentes no soro de bovinos e ovinos,
19 levando-se em consideração a importância de um diagnóstico eficaz para estas populações.

20 Nenhuma reação foi observada quando utilizamos soro de bovino positivo para *T.*
21 *gondii* no WB, com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, comprovando que as proteínas
22 expressas, de forma truncada, não compartilham epítópos com às proteínas similares do
23 protozoário relacionado, sendo uma vantagem quando comparado com a IFI.

24 Muitos estudos descrevem a utilização de proteínas específicas de *N. caninum*, para o
25 diagnóstico da neosporose. A maioria dos trabalhos desenvolvidos nos últimos anos utilizam

1 proteínas recombinantes produzidas em sistema de expressão bacteriano, no entanto, outros
2 sistemas alternativos podem ser utilizados. Dong e colaboradores (2013) relatam a expressão
3 da proteína NcSAG1 em sistema de expressão de larvas de insetos. Os autores desenvolveram
4 anticorpo específico anti-*N. caninum*, utilizando a tecnologia de *Phage Display* para detecção
5 direta do parasito. Fernandes Pinheiro et al. (2015) descrevem a utilização da proteína
6 NcSRS2 em um ELISA indireto para ovinos, utilizando *Pichia pastoris* como sistema de
7 expressão. Neste trabalho, os autores descrevem 100% de sensibilidade, e 94,5% de
8 especificidade, resultados similares aos encontrados em nosso estudo, no entanto obtivemos
9 100% de sensibilidade e 97,2% de especificidade, quando utilizadas as proteínas NcSRS2 e
10 NcSAG1 em associação, demonstrando uma melhor eficiência nos resultados.

11 Wilkowsky et al. (2011) relatam o desenvolvimento de um imunoensaio em linha
12 (APIA - *Antigen Print Immunoassay*) para bovinos, utilizando a proteína rNcSAG1. Este
13 método detecta anticorpos através da aplicação direta de proteínas em linhas na membrana de
14 nitrocelulose. Nesse estudo os autores obtiveram 85% de sensibilidade e 96% de
15 especificidade. Hamidinejat et al. (2015) desenvolveram um ELISA indireto para bovinos,
16 utilizando a proteína rNcGRA7 (proteína de grânulo denso), e obtiveram 94,64% de
17 sensibilidade e 90,38% de especificidade. Já Ghalmi e colaboradores (2014) descrevem a
18 técnica de aglutinação em látex, utilizando a proteína de grânulo denso rNcGRA6, para
19 detecção de anticorpos de bovinos e os resultados apontam uma sensibilidade de 60% e
20 especificidade de 100%. Em nosso estudo, obtivemos 98,1% de sensibilidade e 99,1% de
21 especificidade no ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 para bovinos.

22 A exemplo do trabalho de Ghalmi et al. (2014), é comum se observar que ao se
23 padronizar um diagnóstico, na tentativa de se chegar em uma especificidade de 100%, tende-
24 se a diminuir a sensibilidade, ou vice-versa, pois a capacidade de identificar corretamente
25 animais seronegativos confirmados é um pré-requisito de qualquer teste de diagnóstico para a

1 neosporose (Borsuk et al., 2011). Com a utilização de duas proteínas imunodominantes, sendo
2 expressas na fase aguda (NcSAG1) e na fase crônica (NcSRS2) da infecção, foi possível se
3 aumentar especificidade e permanecer elevada sensibilidade, pois independente do estágio,
4 uma vez que o animal tenha anticorpos contra o protozoário, o teste é capaz de diagnosticar.

5 O formato de ELISA indireto com as proteínas em associação, descrito no presente
6 estudo, permite a avaliação da infecção em rebanhos bovinos e ovinos, bem como a utilização
7 em investigações soroepidemiológicas para estas populações, visto que a sensibilidade,
8 especificidade e valores preditivos mostram resultados altamente precisos (área sob a curva =
9 0,981 e 0,999, para bovinos e ovinos respectivamente).

10

11 **5. CONCLUSÃO**

12 O ELISA indireto com as proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1 associadas, é uma
13 alternativa sensível e específica para o diagnóstico da neosporose bovina e ovina, sendo uma
14 ferramenta confiável para a detecção de anticorpos nestas populações.

15

16 **Agradecimentos**

17 O financiamento para este estudo foi fornecido pela Coordenação de
18 Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de
19 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

20

21 **Conflitos de interesses**

22 Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

23

24 **Referências**

25 Andrade, G. da S., Bruhn, F.R.P., Rocha, C.M.B.M., de Sá Guimarães, A., Gouveia, A.M.G.,

- 1 Guimarães, A.M., 2013. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais
2 state, Brazil. Res. Vet. Sci. 94, 584–586. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.026>
- 3 Andreotti, R., Matos, M.D.F.C., Gonçalves, K.N., Oshiro, L.M., Lima-Junior, M.S.D.C.,
4 Paiva, F., Leite, F.L., 2009. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein
5 NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. Rev. Bras.
6 Parasitol. Vet. 18, 19–22. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01802004>
- 7 Bargieri, D., Lagal, V., Andenmatten, N., Tardieu, I., Meissner, M., Ménard, R., 2014. Host
8 Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: The Junction Conundrum. PLoS Pathog. 10,
9 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004273>
- 10 Borsuk, S., Andreotti, R., Leite, F.P.L., da Silva Pinto, L., Simionatto, S., Hartleben, C.P.,
11 Goetze, M., Oshiro, L.M., Matos, M. de F.C., Berne, M.E.A., 2011. Development of an
12 indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. Vet.
13 Parasitol. 177, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.026>
- 14 Cardoso, J.M.S., Amaku, M., dos Santos Araújo, A.J.U., Gennari, S.M., 2012. A longitudinal
15 study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. Vet. Parasitol. 187,
16 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.019>
- 17 Čobádiová, A., Víchová, B., Majláthová, V., Reiterová, K., 2013. First molecular detection of
18 *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). Vet. Parasitol. 197, 346–349.
19 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.005>
- 20 De Sá, G.L., De Borba Pacheco, D., Monte, L.G., Sinnott, F.A., Xavier, M.A., Rizzi, C.,
21 Borsuk, S., Berne, M.E.A., Andreotti, R., Hartleben, C.P., 2014. Diagnostic potential of
22 Anti-rNcp-43 polyclonal antibodies for the detection of *Neospora caninum*. Curr.
23 Microbiol. 68, 472–476. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0499-y>
- 24 Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Kohsaka, T., Ike, K., Park, E.Y., 2013. Development of Two
25 Murine Antibodies against *Neospora caninum* Using Phage Display Technology and

- 1 Application on the Detection of *N. caninum*. PLoS One 8, 1–9.
- 2 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053264>
- 3 Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., Park, E.Y., 2012. Development of a diagnostic method for
4 neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. BMC Biotechnol.
5 12, 19. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-19>
- 6 Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum*
7 infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am.
8 Vet. Med. Assoc. 193, 1259–63.
- 9 Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok,
10 O.C.H., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for
11 *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 181, 382–387.
12 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018>
- 13 Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2006. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in
14 Ruminants. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 22, 645–671.
15 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.08.001>
- 16 Fernandes Pinheiro, A., Borsuk, S., Elisabeth Aires Berne, M., da Silva Pinto, L., Andreotti,
17 R., Roos, T., Couto Roloff, B., Pereira Leivas Leite, F., 2015. Use of ELISA based on
18 NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis
19 in sheep and dogs. Electron. Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal 24, 148–154.
20 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015015>
- 21 Fernandes Pinheiro, A., Roloff, B.C., Da Silveira Moreira, A., Berne, M.E.A., Silva,
22 R.A., Leite, F.P.L. 2018. Identification of suitable adjuvant for vaccine formulation with
23 the *Neospora caninum* antigen NcSRS2. Vaccine. 36, 1154-1159.
24 10.1016/j.vaccine.2018.01.051.
- 25 Filho, P.C.G.A., Oliveira, J.M.B., Andrade, M.R., Silva, J.G., Kim, P.C.P., Almeida, J.C.,

- 1 Porto, W.J.N., Mota, R.A., 2017. Incidence and vertical transmission rate of *Neospora*
2 *caninum* in sheep. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 52, 19–22.
3 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.05.006>
- 4 Frössling, J., Bonnett, B., Lindberg, A., Björkman, C., 2003. Validation of a *Neospora*
5 *caninum* iscom ELISA without a gold standard. Prev. Vet. Med. 57, 141–153.
6 [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(02\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00216-7)
- 7 Ghalmi, F., Jenkins, M., Azzag, N., Losson, B., 2014. *Neospora caninum* in bovine and
8 canine sera.
- 9 Goff, W.L., McElwain, T.F., Suarez, C.E., Johnson, W.C., Brown, W.C., Norimine, J.,
10 Knowles, D.P., 2003. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a
11 rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle.
12 Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 38–43. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.1.38>
- 13 Haldorson, G.J., Mathison, B.A., Wenberg, K., Conrad, P.A., Dubey, J.P., Trees, A.J.,
14 Yamane, I., Baszler, T. V., 2005. Immunization with native surface protein NcSRS2
15 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission
16 in mice. Int. J. Parasitol. 35, 1407–1415. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.05.013>
- 17 Hamidinejat, H., Seifi Abad Shapouri, M.R., Namavari, M.M., Shayan, P., Kefayat, M., 2015.
18 Development of an indirect ELISA using different fragments of recombinant Ncgra7 for
19 detection of *Neospora caninum* infection in cattle and water buffalo. Iran. J. Parasitol.
20 10, 69–77.
- 21 He, P., Li, J., Gong, P., Liu, C., Zhang, G., Yang, J., Tuo, W., Yang, B., Zhang, X., 2013.
22 *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattle
23 neosporosis. Parasitol. Res. 112, 2117–2120. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3309-3>
- 24 Hiasa, J., Nishimura, M., Itamoto, K., Xuan, X., Inokuma, H., Nishikawa, Y., 2012. Enzyme-
25 linked immunosorbent assays based on *Neospora caninum* dense granule protein 7 and

- 1 profilin for estimating the stage of neosporosis. Clin. Vaccine Immunol. 19, 411–417.
- 2 <https://doi.org/10.1128/CVI.05669-11>
- 3 Hosseininejad, M., Hosseini, F., Mosharraf, M., Shahbaz, S., Mahzounieh, M., Schares, G.,
4 2010. Development of an indirect ELISA test using an affinity purified surface antigen
5 (P38) for sero-diagnosis of canine *Neospora caninum* infection. Vet. Parasitol. 171, 337–
6 342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.003>
- 7 Howe, D.K., Crawford, A.C., Lindsay, D., Sibley, L.D., 1998. The p29 and p35
8 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the
9 family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 66, 5322–5328.
- 10 Pare, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1995. Interpretation of an indirect fluorescent
11 antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. J. Vet. Diagnostic
12 Investig. 7, 273–275. <https://doi.org/10.1177/104063879500700222>
- 13 Pereira, G.R., Vogel, F.S.F., Bohrer, R.C., da Nóbrega, J.E., Ilha, G.F., da Rosa, P.R.A.,
14 Glanzner, W.G., Camillo, G., Braunig, P., de Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2014.
15 *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally
16 infected pregnant heifers. Vet. Parasitol. 199, 129–135.
17 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.018>
- 18 Piagentini, M., Moya-Araujo, C.F., Prestes, N.C., Sartor, I.F., 2012. *Neospora caninum*
19 infection dynamics in dairy cattle. Parasitol. Res. 111, 717–721.
20 <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2891-0>
- 21 Rossi, G.F., Cabral, D.D., Ribeiro, D.P., Pajuaba, A.C.A.M., Corrêa, R.R., Moreira, R.Q.,
22 Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., Silva, D.A.O., 2011. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and
23 *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlandia, Minas Gerais State, Brazil, by
24 different serological methods. Vet. Parasitol. 175, 252–259.
25 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.017>

- 1 Sinnott, F.A., Monte, L.G., Collares, T.F., De Matos, B.M., Pacheco, D.B., Borsuk, S.,
2 Andreotti, R., Hartleben, C.P., 2014. Blocking elisa using recombinant ncsrs2 protein for
3 diagnosing bovine neosporosis. *Curr. Microbiol.* 70, 429–432.
4 <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0737-y>
- 5 Sinnott, F.A., Monte, L.G., Collares, T.F., Silveira, R.M., Borsuk, S., 2017. Review on the
6 immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011–2016). *Vet.*
7 *Parasitol.* 239, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.008>
- 8 Soltani, M., Sadreazzaz, A., Nassiri, M., Tahmoerespoor, M., 2013. Cloning, nucleotide
9 sequencing and bioinformatics study of NcSRS2 gene, an immunogen from Iranian
10 isolate of *Neospora caninum*. *Iran. J. Parasitol.* 8, 114–128.
- 11 Wilkowsky, S.E., Bareiro, G.G., Mon, M.L., Moore, D.P., Caspe, G., Campero, C.M., Fort,
12 M., Romano, M.I., 2011. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1
13 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Vet Diag Invest* 23, 971–
14 976. <https://doi.org/10.1177/1040638711416845>
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1 **Legendas das figuras**

2

3 Figura 1: *Western blotting* para avaliação da antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e
4 rNcSAG1. MP. Marcador de peso molecular Rainbow™ (GE Healthcare); 1. Proteína
5 rNcSRS2 e soro bovino positivo para toxoplasmose; 2. Proteína rNcSAG1 e soro bovino
6 positivo para toxoplasmose; 3. Proteína rNcSRS2 e pool de soros bovinos positivos para
7 neosporose; 4. Proteína rNcSRS2 e pool de soros ovinos positivos para neosporose; 5.
8 Proteína rNcSAG1 e pool de soros bovinos positivos para neosporose; 6. Proteína rNcSAG1 e
9 pool de soros ovinos positivos para neosporose;

10

11 Figura 2: ELISA indireto realizado com as proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1, de
12 forma individual ou em associação, testadas contra 106 soros bovinos positivos e 110 soros
13 bovinos negativos para neosporose, obtida através do *Receiver Operating Characteristic*
14 (ROC). (A): ELISA rNcSRS2, (B): ELISA rNcSAG1 e (C): ELISA rNcSRS2/rNcSAG1.

15

16 Figura 3: ELISA indireto realizado com as proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1, de
17 forma individual ou em associação, testadas contra 48 soros ovinos positivos e 106 soros
18 bovinos negativos para neosporose, obtida através do *Receiver Operating Characteristic*
19 (ROC). (A): ELISA rNcSRS2, (B): ELISA rNcSAG1 e (C): ELISA rNcSRS2/rNcSAG1.

20

21 Figura 4: Análise ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o ELISA indireto com as
22 proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os soros bovinos.
23 (A): Curva ROC para o ELISA com rNcSRS2 demonstrando uma área sob a curva de 0,930
24 (0,887-0,960 com 95% de intervalo de confiança), (B): Curva ROC para o ELISA com
25 rNcSAG1 demonstrando uma área sob a curva de 0,901 (0,853-0,937 com 95% de intervalo de

1 confiança) e (C): Curva ROC para o ELISA com rNcSRS2/rNcSAG1 demonstrando uma área
2 sob a curva de 0,981 (0,953-0,995 com 95% de intervalo de confiança).

3

4 Figura 5: Análise ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o ELISA indireto com as
5 proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os soros ovinos.
6 (A): Curva ROC para o ELISA com rNcSRS2 demonstrando uma área sob a curva de 0,916
7 (0,861-0,954 com 95% de intervalo de confiança), (B): Curva ROC para o ELISA com
8 rNcSAG1 demonstrando uma área sob a curva de 0,897 (0,838-0,940 com 95% de intervalo de
9 confiança) e (C): Curva ROC para o ELISA com rNcSRS2/rNcSAG1 demonstrando uma área
10 sob a curva de 0,999 (0,975-1,000 com 95% de intervalo de confiança).

11

12 Figura 6: Valores preditivos positivos (losango) e negativos (quadrados) para o ELISA com
13 as proteínas em associação, em níveis de prevalência variáveis de neosporose. Os valores
14 foram determinados pela análise ROC, baseando-se na sensibilidade e especificidade do
15 ELISA. (A): ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 – Bovinos e (B): ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 -
16 Ovinos.

17

18

19

20

21

22

23

1 Sinnott et. al. Fig 1

2

3

4

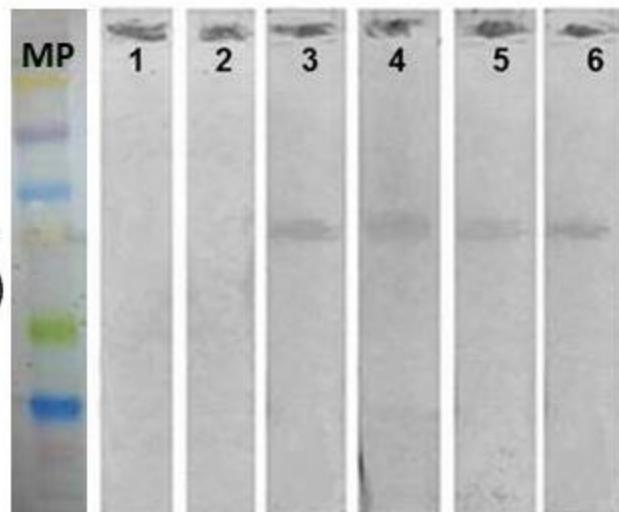
5

6

7

8

9 →
10 (≈ 30 kDa)



11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

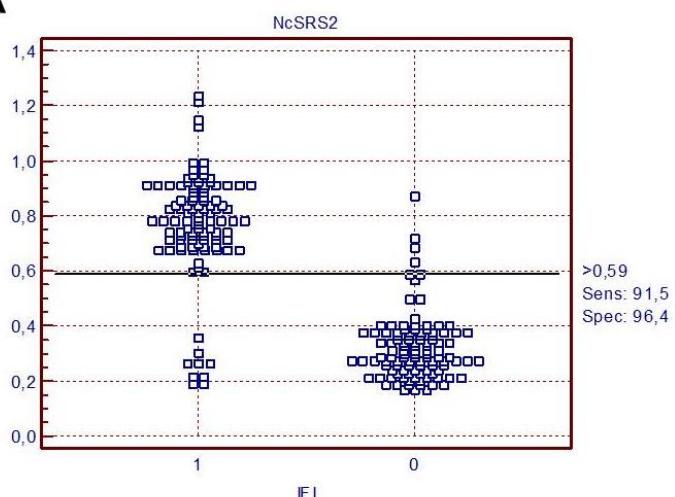
26

27

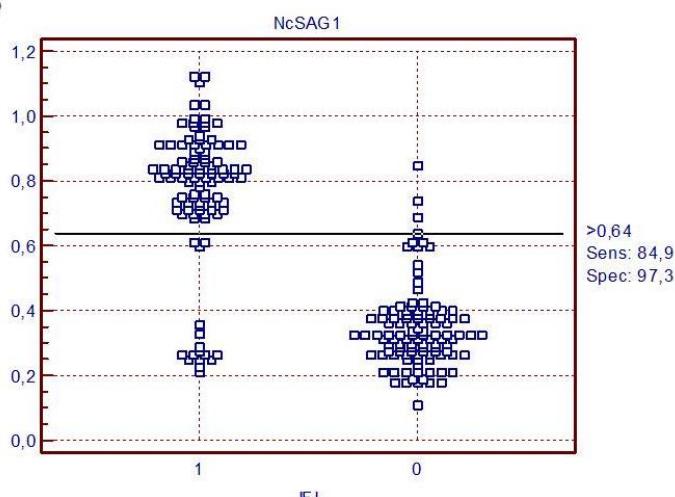
1 Sinnott et. al. Fig 2

2

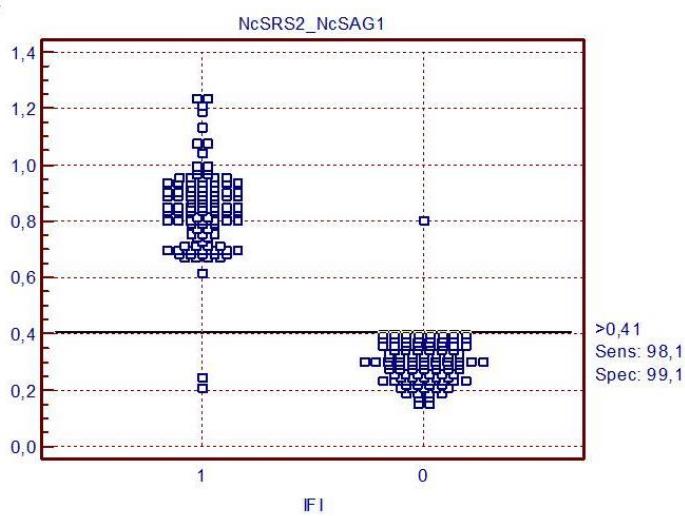
A



B



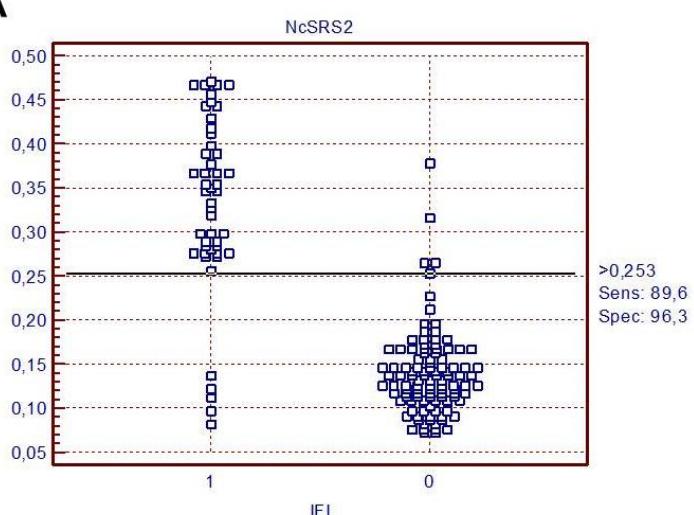
C



1 Sinnott et. al. Fig 3

2

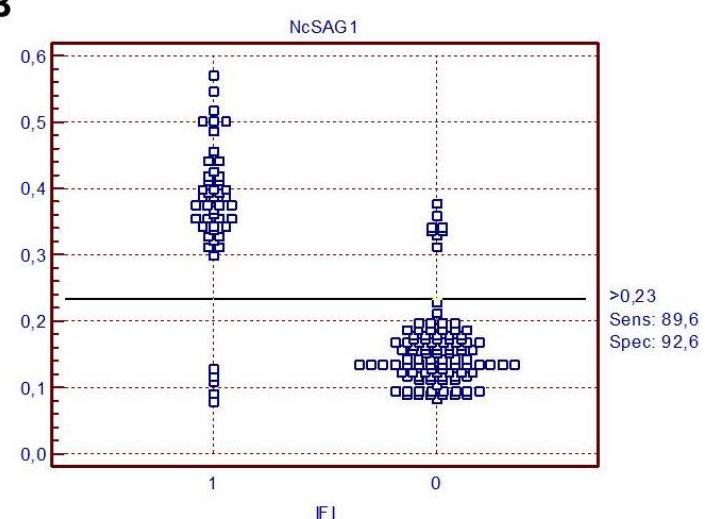
A



10

11

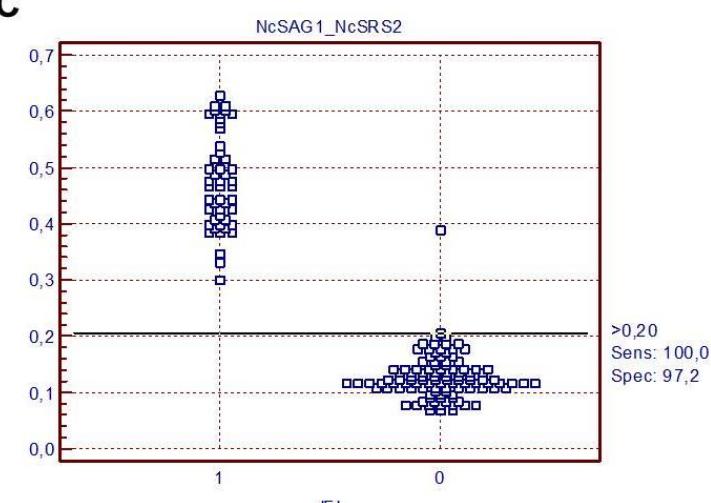
B



18

19

C

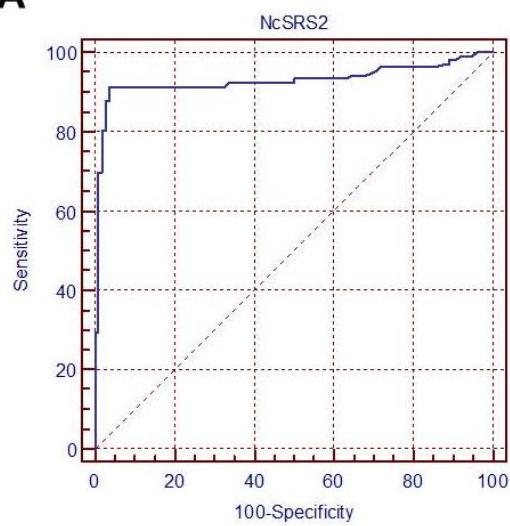


27

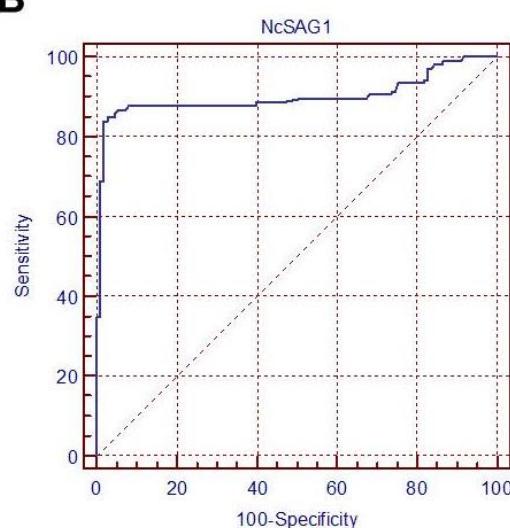
1 Sinnott et. al. Fig 4

2

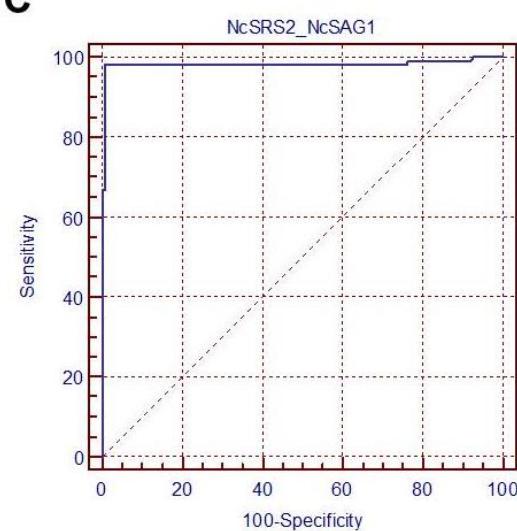
A



B



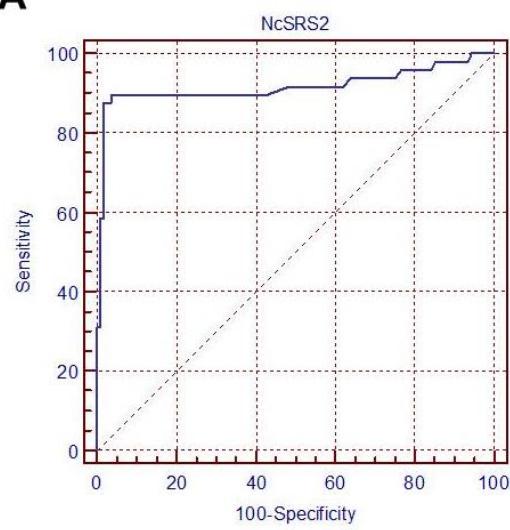
C



1 Sinnott et. al. Fig 5

2

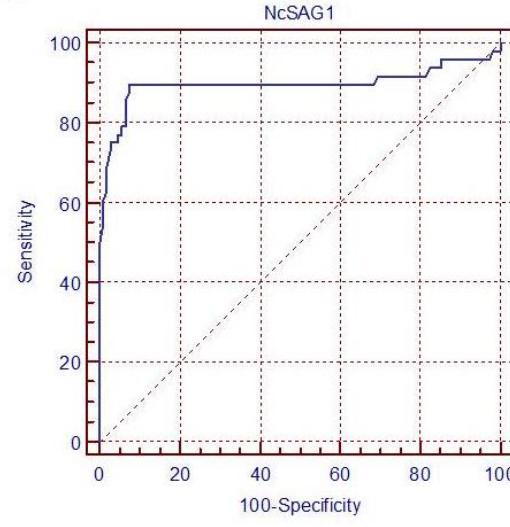
A



10

11

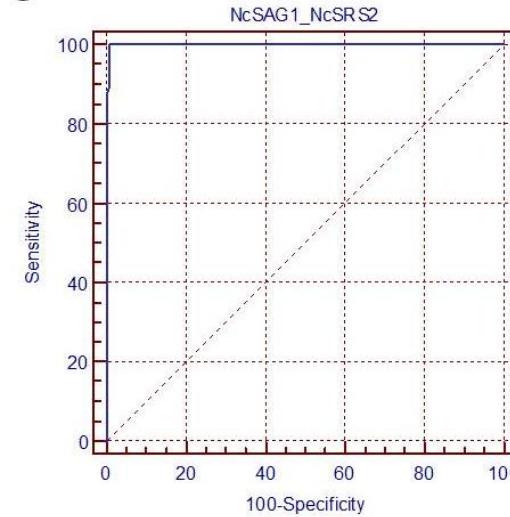
B



19

20

C

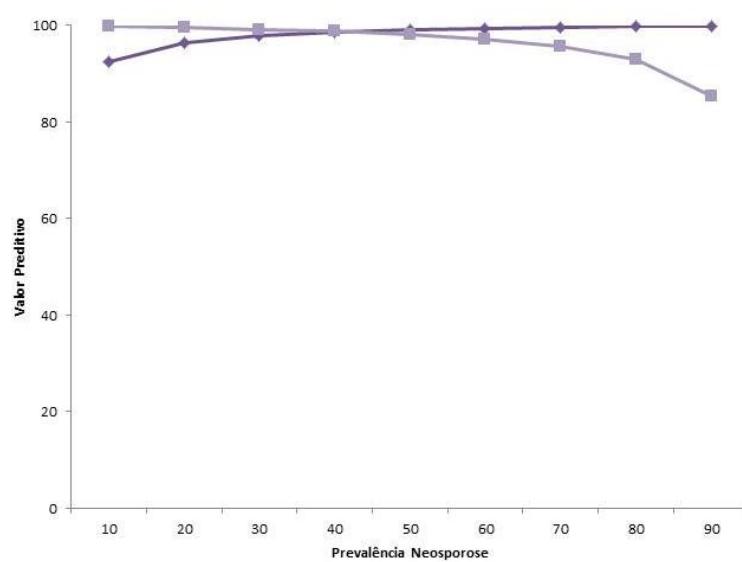


27

1 Sinnott et. al. Fig 6

2

A



3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

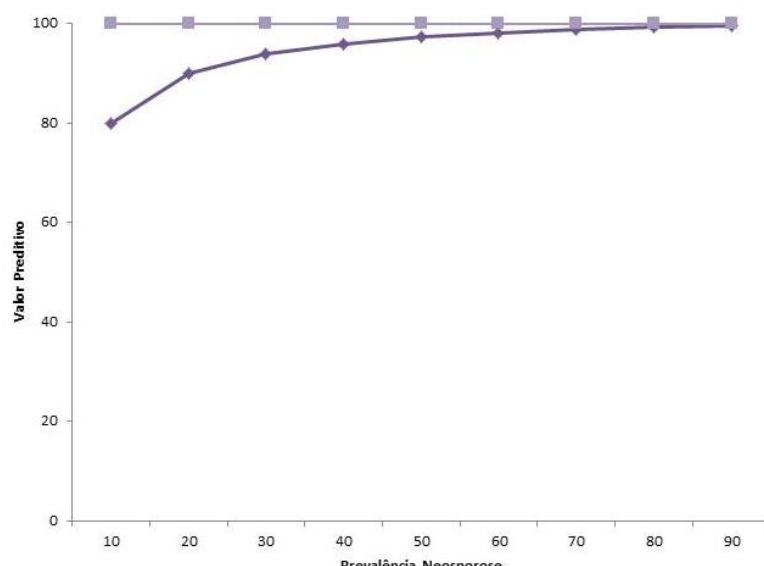
24

25

26

27

B



5 PATENTE

ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Neospora caninum* NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA A NEOSPOROSE

Este documento será enviado para a Coordenação de Inovação Tecnológica (CIT) da UFPel, para solicitação de depósito de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)

O documento está formatado de acordo com exigências do INPI, disponíveis no link:
<https://wp.ufpel.edu.br/cit/propriedade-intelectual/deposito-de-patentes-e-registro-de-marcas-e-programas-de-computador/normas-reguladoras/>

ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Neospora caninum* NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA A NEOSPOROSE

RESUMO

A presente invenção refere-se à utilização da associação das proteínas recombinantes antigênicas NcSRS2 e NcSAG1, ambas do patógeno *Neospora caninum*, em um ensaio no formato ELISA indireto para o diagnóstico da neosporose bovina e ovina. Tal invenção objetiva sanar a problemática vinculada às reações cruzadas com outros protozoários do filo Apicomplexa, presentes no teste padrão utilizado, além de fornecer uma opção de menor custo, proporcionando facilidade de automação e realização de análise em grande escala. A associação das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1 em um teste ELISA indireto, geraram resultados satisfatórios quando comparada a utilização das mesmas proteínas de formas isoladas. Obtendo-se um teste com sensibilidade de 98,1% e especificidade de 99,1%, para os bovinos, e sensibilidade de 100% e especificidade de 97,2%, para ovinos. Os resultados mostram que a associação das proteínas recombinantes utilizadas no imunoensaio desenvolvido, é uma alternativa viável para o diagnóstico da neosporose bovina e ovina. Setor técnico: A61K 39/00, A61K 39/002 e A61K 39/012.

ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Neospora caninum* NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA A NEOSPOROSE

RELATÓRIO DESCRIPTIVO

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

9 [001] A presente invenção refere-se à utilização da
10 associação das proteínas recombinantes antigênicas NcSRS2 e
11 NcSAG1, ambas do patógeno *Neospora caninum*, em um ensaio no
12 formato ELISA indireto para o diagnóstico da neosporose. Está
13 enquadrada dentro da classificação internacional de patentes
14 nos campos de invenção A61K 39/00, A61K 39/002 e A61K 39/012.

Descrição do estado da técnica

[002] *Neospora caninum* é um parasito heteroxênico, pertencente ao filo Apicomplexa, que foi isolado pela primeira vez em 1988, de tecidos de cães com paralisia cerebral. É o agente causador da doença conhecida por neosporose, sendo esta uma das principais causas de abortos em bovinos no mundo, tanto na bovinocultura de leite quanto na de corte. *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório, sendo os canídeos os hospedeiros definitivos, e os hospedeiros intermediários podendo ser uma ampla variedade de animais, destacando-se os bovinos e os ovinos como sendo os hospedeiros mais estudados. A neosporose canina se caracteriza por paralisia muscular, enquanto a neosporose bovina apresenta abortos e mortalidade neonatal. Já a nesporose ovina ocorre com menor frequência, e está associada a infecções congênitas e nascimentos de cordeiros fracos (**DUBEY J. P., HATTEL A. L., LINDSAY D. S. TOPPER M. J.** *Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission, American Veterinary Medical Association, v. 193,*

1 p. 1259-1263, 1988; COBADIOVA A., VICHובה B., MAJLATHOVA V.,
2 REITEROVA K. First molecular detection of *Neospora caninum* in
3 European brown bear (*Ursus arctos*), Veterinary Parasitology,
4 v. 197, p. 346-349, 2013; HOWE L., COLLETT M.G., PATTISON
5 R.S., MARSHALL J., WEST D.M., POMROY W.E. Potential
6 involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine
7 abortions in New Zealand, Veterinary Parasitology, v.185,
8 p.64-71, 2012; DUBEY J. P., LINDSAY D. S. A review of *Neospora*
9 *caninum* and neosporosis, Veterinary Parasitology, v. 67, p. 1-
10 59, 1996).

11 [003] O ciclo de vida desse protozoário envolve um
12 hospedeiro definitivo onde ocorre a reprodução sexuada, e
13 hospedeiros intermediários apresentando a reprodução
14 assexuada. Até o momento são conhecidos como hospedeiros
15 definitivos os canídeos, como por exemplo, cães domésticos e
16 selvagens, coiotes, lobos cinzentos e dingos. Dentre os
17 principais hospedeiros intermediários destacam-se: bovinos e
18 ovinos. Esse parasito se apresenta em 3 formas infectantes
19 conhecidas: os oocistos, os taquizoítos e os bradizoítos. Os
20 oocistos são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo e
21 estes se tornam esporulados no ambiente, contendo dois
22 esporocistos com quatro esporozoítos cada, que ao serem
23 ingeridos infectam os hospedeiros intermediários. Os
24 esporozoítos são liberados e invadem as células do trato
25 intestinal, transformando-se em taquizoítos, que se reproduzem
26 de forma rápida, representando a fase aguda da doença e são
27 encontrados principalmente em macrófagos, fibroblastos e no
28 sistema nervoso, mais especificamente, no cérebro. No interior
29 das células permanecem de forma latente dando origem aos
30 bradizoítos, formando cistos teciduais. Os hospedeiros
31 definitivos adquirem a infecção ingerindo tecidos de animais
32 infectados. (DONAHOE S. L., LINDSAY S. A., KROCKENBERGER
33 M., PHALEN D., SLAPETA, J. A review of neosporosis and
34 pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife,

1 Int J Parasitol Parasites Wildl, v. 4, p. 216 - 238, 2015;
2 REICHEL M. P., ELLIS J. T., DUBEY J. P. Neosporosis and
3 hammondiosis in dogs, Journal of Small Animal Practice, v.48,
4 p. 308-312, 2007; HADDAD J. P. A., DOHOO I. R., VANLEEWEN J.
5 A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle - a
6 Canadian perspective, The Canadian Veterinary Journal, v. 46,
7 p. 230, 2005; PETERS M., LUTKEFES E., HECKEROTH A. R., SCHARES
8 G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for
9 *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally
10 infected dogs and cattle, Int. J. Parasitol., v.31, p.1144-
11 1148, 2001).

12 [004] Em bovinos a transmissão vertical é responsável por
13 até 95% das infecções. Não obstante, este tipo de transmissão
14 não confere infecção em 100% dos casos, sendo necessária a
15 transmissão horizontal para que o parasito se mantenha no
16 rebanho (CABRAL A. D., CAMARGO C. N., GALLETI N. T., OKUDA, L.
17 H., PITUCO E. M., FAVA C. D. Diagnosis of *Neospora caninum* in
18 bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-
19 PCR, Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 18,
20 p. 14-19, 2009; SANTOLARIA P., ALMERIA S., MARTINEZ-BELLO D.,
21 NOGAREDA C., MEZO M., GONZALEZ-WARLETA M., CASTRO-HERMIDA J.
22 A., PABON M., YANIZ J. L., LOPEZ-GATIUS F. Different humoral
23 mechanisms against *Neospora caninum* infection in purebreed and
24 crossbreed beef/dairy cattle pregnancies, Veterinary
25 Parasitology, v. 178, p. 70-76, 2011).

26 [005] *N. caninum* possui grande importância econômica nos
27 rebanhos bovinos, pois causa problemas reprodutivos, gastos
28 com o estabelecimento de uma nova gestação, reposição dos
29 animais abatidos, possíveis perdas na produção de leite,
30 aumento dos gastos com profissionais para o diagnóstico, sendo
31 também considerada uma das principais causas de abortos em
32 bovinos, acarretando no abate das fêmeas adultas que
33 abortaram. Um estudo realizado em dez países, onde foi
34 avaliado o impacto dos abortos causados por *N. caninum*,

1 mostrou uma prevalência variando de 10 a 60%, com uma
2 estimativa média de perda econômica global de 1 bilhão de
3 dólares, variando em 2,4 bilhões por ano (**REICHEL M. P.,**
AYANEGUI-ALCERRECA A. M., GONDIM L. F., ELLIS J. T. What is
5 the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the
6 billion dollar question, Int. J. Parasitol., v.43, p.133-142,
7 2013).

8 [006] Em ovinos naturalmente infectados, a doença não está
9 sempre associada a abortos, apesar das evidências que mostram
10 o papel abortivo do organismo em infecções experimentais. Em
11 um estudo recente, os autores demonstraram que o estágio da
12 gestação tem papel fundamental no curso da neosporose em
13 ovelhas prenhas. Nesse trabalho, a infecção no primeiro e
14 segundo terço da gestação causou uma taxa de aborto em 100%
15 dos animais infectados, enquanto que durante o último terço da
16 gestação, resultou no parto prematuro de cordeiros infectados,
17 fracos ou clinicamente saudáveis. Os ovinos são altamente
18 suscetíveis à infecção por *N. caninum*, e apresentam
19 sintomatologia semelhante à de bovinos, por isso consistem em
20 um ótimo modelo animal experimental, possuindo vantagens sobre
21 os bovinos, incluindo o tamanho, duração da gestação e o
22 custo. Mais estudos são necessários para elucidar
23 completamente a patogênese da infecção em ovinos. Embora não
24 se tenha o conhecimento do real impacto econômico da
25 enfermidade nessa população, imagina-se que as perdas sejam
26 significativas (**ARRANZ-SOLÍS D., BENAVIDES J.,**
REGIDOR-CERRILLO J., UERTES M., FERRE I., DEL FERRERAS M.,
COLLANTES-FERNÁNDEZ E., HEMPHILL A., PEREZ V., ORTEGA-MORA L.
M. Influence of the gestational stage on the clinical course,
lesional development and parasite distribution in
experimental ovine neosporosis, Vet. Res., v. 46, p. 1-13,
2015; **FTHENAKIS G. C., MAVROGIANNI V.S., GALLIDIS E.,**
PAPADOPoulos E. Interactions between parasitic infections and

1 reproductive efficiency in sheep. *Vet Parasitol.*, v. 28, p. 56-
2 66, 2015)

3 [007] Existem vários fatores não esclarecidos acerca da
4 resposta imune induzida frente à infecção por *N. Caninum*. No
5 entanto a resposta imune inata é a primeira linha de defesa
6 contra agentes infecciosos, a qual é responsável por fazer com
7 que, no início de uma infecção, os patógenos invasores sejam
8 capturados por células apresentadoras de抗ígenos, as quais
9 liberam citocinas, como as interleucinas 12 (IL-12), que são
10 indutoras da citotoxicidade de células natural killer (NK), e
11 estas células, durante a infecção causada por patógenos
12 intracelulares, produzem interferon gama (IFN-γ). O IFN-γ é
13 uma citocina pró-inflamatória de extrema importância para a
14 defesa do hospedeiro, sendo conhecida por limitar a
15 multiplicação do parasito (Klevar S., Kulberg S., Boysen
16 P., Storset A.K., Moldal T., Björkman C., Olsen I. *Natural
17 killer cells act as early responders in an experimental
18 infection with Neospora caninum in calves, International
19 journal for parasitology*, v. 37, p. 329-339, 2007).

20 [008] Como resultado da expressão de IFN-γ, os níveis na
21 produção de IgG2 são aumentados e estes anticorpos são
22 essenciais na resposta imune contra patógenos, indicando uma
23 predominância da resposta Th1. Os níveis de anticorpos de
24 classe IgM específicos para neosporose podem ser detectados
25 após duas semanas de infecção, caracterizando a infecção
26 aguda. Porém, diminuem consideravelmente até quatro semanas,
27 sendo difícil a detecção destes anticorpos após este período.
28 Os níveis de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2), são baixos nos
29 primeiros dias da infecção, aumentando durante as primeiras
30 semanas, indicando a fase crônica da doença. Os bovinos, de
31 forma geral, apresentam soroconversão rápida com altos títulos
32 de anticorpos IgG2 e tendem a manter esses títulos durante um
33 longo período (ALMERIA S., NOGAREDA C., SANTOLARIA P., GARCIA-
34 ISPIERTO I., YANIZ J. L., LOPEZ-GATIUS, F. Specific anti-

1 *Neospora caninum IgG1 and IgG2 antibody responses during*
2 *gestation in naturally infected cattle and their relationship*
3 *with gamma interferon production, Veterinary immunology and*
4 *immunopathology, v. 130, p. 35-42, 2009; DION S., GERMON S.,*
5 *GUITON R., DUCOURNAUC., DIMIER-POISSON I. Functional*
6 *activation of T cells by dendritic cells and macrophages*
7 *exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*, Int J*
8 *Parasitol, v. 41, p. 685-95, 2011;*

9 [009] A inibição da multiplicação de parasitos através de
10 citocinas pró-inflamatórias e o bloqueio da infecção do
11 parasito por meio de anticorpos, são os principais eventos
12 imunológicos capazes de controlar a infecção e de evitar a
13 transformação de taquizoítos para bradizoítos. A
14 recrudescência de bradizoítos, para a forma ativa de
15 taquizoítos ocorre quando as respostas imunes mediadas por
16 células T e IFN- γ são prejudicadas, o que acontece em
17 indivíduos imunosuprimidos (**INNES E. A. The host-parasite**
18 **relationship in pregnant cattle infected with *Neospora***
19 ***caninum*, Parasitology, v. 134, p. 1903-1910, 2007**).

20 [010] Anticorpos resultantes da infecção desempenham um
21 papel auxiliar em infecções posteriores participando da
22 neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares.
23 Estudos sugerem que a imunidade protetora pode ser alcançada
24 devido a uma infecção anterior, e pode ser mantida através de
25 mecanismos não elucidados, pois animais com evidências de
26 exposição prévias têm menor probabilidade de aborto do que
27 animais com infecção primária (**INNES E. A. The host-parasite**
28 **relationship in pregnant cattle infected with *Neospora***
29 ***caninum*, Parasitology, v. 134, p. 1903-1910, 2007; Mcallister**
30 **M. M., Bjorkman C., Anderson-Sprecher R., Rogers D. G.**
31 **Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and**
32 **protective immunity in a herd of beef cows, Journal of the**
33 **American Veterinary Medical Association, v. 217, p.881-887,**
34 **2000**).

1 [011] Como não existem até o momento vacinas e nem
2 tratamentos eficientes disponíveis, o controle da disseminação
3 da doença nos rebanhos é a melhor estratégia a ser adotada.
4 Dessa forma, o diagnóstico torna-se uma ferramenta de extrema
5 importância. Dentro os métodos utilizados, destacam-se os
6 exames histológicos, imunohistoquímica (IHC), Reação em Cadeia
7 da Polimerase (PCR), Imunofluorescência Indireta (IFI) e os
8 ensaios imunoenzimáticos, como o ensaio de imunoabsorção
9 enzimática - ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay)
10 (**SINNOTT F. A., MONTE L. G., COLLARES T. F., SILVEIRA R. M.,**
11 **BORSUK S. Review on the immunological and molecular diagnosis**
12 **of neosporosis (years 2011-2016), Veterinary Parasitology, v.**
13 **239, p. 10-25, 2017; DUBEY J. P., SCHARES G. Neosporosis in**
14 **animals-The last five years, Vet. Parasitol., v. 180, p. 90-**
15 **108, 2011).**

16 [012] Os exames histológicos podem confirmar a neosporose
17 em fetos abortados pela visualização das lesões
18 características causadas pelo protozoário, como encefalite não
19 supurativa, miocardite, hepatites, etc. Porém, esta técnica
20 necessita sempre da confirmação da presença do parasito já que
21 outros protozoários poderiam causar lesões similares e a
22 ausência de outros patógenos (**DUBEY J. P., SCHARES G.**
23 **Neosporosis in animals--the last five years, Vet Parasitol, v.**
24 **180, p. 90-108, 2011).**

25 [013] A técnica de imunohistoquímica (IHC) já é um método
26 mais eficaz comparado com os exames histológicos, e é
27 comumente utilizada para a detecção do parasito em fetos
28 abortados, pois geralmente a quantidade de *N. caninum* nos
29 tecidos é pequena, dificultando a visualização pela técnica de
30 coloração hematoxilina e eosina (HE) utilizada pelos ensaios
31 histopatológicos. Contudo, a eficiência da IHC é prejudicada
32 por amostras de tecidos de abortos autolisados (**CABRAL A. D.,**
33 **CAMARGO C. N., GALLETI N. T., OKUDA L. H., PITUCO E. M., FAVA**
34 **C. D. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by**

1 histology, immunohistochemistry, and nested-PCR, Rev Bras
2 Parasitol Vet, v. 18, p. 14-9, 2009; KHODAKARAM-TAFTI A.,
3 MANSOURIAN M., NAMAVARI M., HOSSEINI, A. Immunohistochemical
4 and polymerase chain reaction studies in *Neospora caninum*
5 experimentally infected broiler chicken embryonated eggs, Vet
6 Parasitol, v. 188, p. 10-3, 2012).

7 [014] A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é
8 uma ferramenta muito importante para detecção de *N. caninum*,
9 tendo como vantagens ser uma técnica rápida e possuir alta
10 sensibilidade e especificidade. Porém, ainda é uma técnica de
11 valor elevado. A PCR pode ser aplicada para o diagnóstico,
12 para o sequenciamento, quantificação de DNA do protozoário e
13 identificação de novos hospedeiros do parasito. Vários
14 formatos de PCRs vêm sendo aplicados para o diagnóstico da
15 neosporose, tais como o PCR em Tempo Real, Nested PCR e
16 Multiplex PCR, os quais podem utilizar tecidos de fetos
17 abortados, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano,
18 sangue, fezes, leite, sêmen, etc. (AL-QASSAB S., REICHEL M. P.,
19 ELLIS J. A second generation multiplex PCR for typing strains
20 of *Neospora caninum* using six DNA targets, Mol Cell Probes.,
21 v. 24, p. 20-6, 2010; . PEREIRA, G. R., VOGEL, F. S., BOHRER,
22 R. C., DA NOBREGA, J. E. J., ILHA, G. F., DA ROSA, P. R.,
23 GLANZNER W. G., CAMILLO G., BRAUNIG P., DE OLIVEIRA J.
24 F., GONÇALVES P. B. *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan
25 real-time PCR assay in experimentally infected pregnant
26 heifers, Vet Parasitol, v. 199, p. 129-35, 2014; REISBERG K.,
27 SELIM A. M., GAEDE W. Simultaneous detection of *Chlamydia*
28 spp., *Coxiella burnetii*, and *Neospora caninum* in abortion
29 material of ruminants by multiplex real-time polymerase chain
30 reaction, J Vet Diagn Invest, v. 25, p. 614-9, 2013).

31 [015] A infecção por *N. caninum* estimula a resposta imune
32 humoral do hospedeiro, conforme descrito anteriormente, sendo
33 possível a detecção de anticorpos contra antígenos
34 imunodominantes presentes nas formas de taquizoítos ou

1 bradizoítos, estabelecendo-se assim o estágio agudo ou crônico
2 da infecção. Devido a esta resposta imunológica, pode-se
3 detectar a doença através de testes sorológicos, onde os
4 diagnósticos indiretos possuem grandes vantagens, como serem
5 utilizados no *antemortem* dos animais e também por fornecerem
6 informações quanto ao estágio da doença (DUBEY J. P., LINDSAY,
7 D. S. *Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in*
8 *ruminants*, Vet Clin North Am Food Anim Pract, v. 22, p. 645-
9 71, 2006; HIASA J., KOHARA J., NISHIMURA M., XUAN X.,
10 TOKIMITSU H., NISHIKAWA Y. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1
11 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation, Vet
12 Parasitol, v. 187, p. 379-85, 2012; TEMBUE A. A., RAMOS R. A.,
13 DE SOUSA T. R., ALBUQUERQUE A. R., DA COSTA A. J., MEUNIER I.
14 M., MEUNIER I. M., FAUSTINO M. A. Serological survey of
15 *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State,
16 Brazil, Rev Bras Parasitol Vet, v. 20, p. 246-8, 2011).

17 [016] A técnica sorológica padrão para o diagnóstico da
18 neosporose é a Imunofluorescência Indireta (IFI), sendo o
19 primeiro ensaio sorológico descrito para o diagnóstico da
20 doença. No entanto, para sua execução se faz necessário à
21 manutenção de linhagens celulares infectadas com taquizoítos,
22 o que representa um alto custo no diagnóstico. Além disso, a
23 subjetividade do resultado é diretamente dependente da
24 experiência do executor do teste, e sua especificidade pode
25 ser prejudicada devido à reação de anticorpos presentes em
26 amostras positivas contra outros protozoários do mesmo filo,
27 além do fato de que na fase crônica (cistos teciduais contendo
28 bradizoítos) outros抗ígenos estimulam, de forma muito mais
29 eficiente, a produção de anticorpos específicos, e a detecção
30 de anticorpos anti-taquizoítos (forma evolutiva utilizada na
31 IFI) pode ser comprometida (PIAGENTINI M., MOYA-ARAUJO C. F.,
32 PRESTES N. C., SARTOR I. F. *Neospora caninum infection*
33 *dynamics in dairy cattle*, Parasitol Res, v. 111, p. 17-21,
34 2012; DUBEY J. P., HATTEL A. L., LINDSAY D. S., TOPPER M. J.

1 Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the
2 causative agent and experimental transmission, J Am Vet Med
3 Assoc, v. 193, p.1259-63, 1988; DUBEY J. P., SCHARES G.
4 Diagnosis of bovine neosporosis, Vet Parasitol, v, 140, p. 1-
5 34, 2006).

6 [017] Vários testes sorológicos para detecção de
7 anticorpos contra *N. caninum* estão disponíveis comercialmente,
8 sendo a grande maioria no formato de ensaios imunoenzimáticos
9 (ELISA) indiretos, os quais utilizam, quase que na totalidade,
10 um lisado de taquizoítos ou抗igenos nativos purificados para
11 sensibilização das placas de poliestireno. O uso de抗igenos
12 nativos ou totais diminui a especificidade do teste devido às
13 reações cruzadas com outros coccídeos. Portanto, a busca por
14 alvos proteicos específicos, exclusivos de *N. caninum*, parece
15 ser promissora para o desenvolvimento de ensaios de
16 diagnóstico sensíveis e específicos (WAPENAAR W., BARKEMA H.
17 W., VANLEEUWEN J. A., MCCLURE J. T., O'HANLEY R. M., KWOK O.
18 C., THULLIEZ P., DUBEY J. P., JENKINS M. C. Comparison of
19 serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum*
20 infection in cattle, Vet Parasitol, v. 143, p. 166-73, 2007;
21 YBANEZ R. H., TERKAWI M. A., KAMEYAMA K., XUAN X., NISHIKAWA
22 Y. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-
23 like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum*
24 infection, Clin Vaccine Immunol, v. 20, p. 1617-22, 2013).

25 [018] Uma variedade de抗igenos de *N. caninum* vem sendo
26 descrita, muitos dos quais são possíveis alvos vacinais e de
27 diagnóstico. Entre os抗igenos utilizados para o diagnóstico
28 da neosporose, as proteínas de superfície celular ganham
29 destaque por serem necessárias à sobrevivência do patógeno,
30 uma vez que iniciam as interações com moléculas da superfície
31 da célula do hospedeiro, além de ativarem o sistema imune do
32 mesmo. Os抗igenos de superfície pertencem a uma superfamília
33 de proteínas estruturalmente relacionadas ao principal
34 抗igeno de superfície (SAG1 (Surface Antigen Glycoprotein))

1 conhecidas como proteínas SRS (**SAG 1 - Related Sequences**)
2 ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é uma
3 estrutura glicolipídica que se liga covalentemente às
4 proteínas como uma modificação pós-traducional, levando à
5 ancoragem da proteína a parte externa da membrana plasmática,
6 possibilitando a mediação de diversas funções biológicas
7 (**Bargieri D., Lagal V., Andenmatten N., Tardieu I., Meissner M., Ménard R.** Host cell invasion by apicomplexan parasites: the junction conundrum, *PLoS Pathog*, v. 18, 2014; **Soltani M., Sadrebazzaz A., Nassiri M., Tahmoorespoor M.** Cloning, Nucleotide Sequencing and Bioinformatics Study of NcSRS2 Gene, an Immunogen from Iranian Isolate of *Neospora caninum*, *Iranian J Parasitol*, v. 8, p. 114-128, 2013).

14 [019] Os principais antígenos imunodominantes de
15 superfície celular de *N. caninum*, já definidos e
16 caracterizados, são de 29 (Nc-p29) e 35 (Nc-p35) kilodaltons
17 (kDa), que demonstraram ser respectivamente idênticos aos
18 antígenos Nc-p36 (36kDa) e Nc-p43 (43kDa). Tais diferenças de
19 pesos moleculares foram atribuídas a diferentes condições por
20 eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Análises de
21 similaridade revelaram que Nc-p29/Nc-p36 apresentam
22 aproximadamente 53% de homologia com a proteína SAG1 de
23 *Toxoplasma gondii*, e Nc-p35/Nc-p43 indicam aproximadamente 44%
24 de identidade com o antígeno SRS2 de *T. gondii*. Baseado nessas
25 homologias, foi proposto que Nc-p29/Nc-p36 fossem designadas
26 NcSAG1 e Nc-p35/Nc-p43 nomeadas de NcSRS2, utilizando a
27 nomenclatura similar proposta para *T. gondii*, além de unificar
28 as nomenclaturas das proteínas de *N. caninum* (**HEMPHILL A., GOTTSSTEIN B.** Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites, *Parasitol Res.*, v.82, p. 497-504, 1996; **HOWE D. K.; CRAWFORD A. C.; LINDSAY D.; SIBLEY L. D.** The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*, *Infection and Immunity*, v. 66, p.5322-

1 5328, 1998; Hemphill A., Fuchs N., Sonda S., Hehl A. The
2 antigenic composition of *Neospora caninum*, Int J Parasitol, v.
3 29, p. 1175-1188, 1999).

4 [020] A proteína NcSRS2 é um antígeno comprovadamente
5 envolvido de maneira funcional no processo de adesão e invasão
6 na célula hospedeira. Ela está presente tanto em taquizoítos
7 quanto em bradizoítos, no entanto têm sua expressão de forma
8 diferenciada dependendo do estágio da doença. Estudos *in vitro*
9 demonstram que o bloqueio desta proteína limita a capacidade
10 de adesão e penetração de células hospedeiras pelo parasito,
11 salientando a importância desta proteína nestes processos. A
12 proteína NcSAG1, também possui grande importância no
13 reconhecimento e invasão da célula, além de ser considerada
14 uma das proteínas mais imunogênicas de *N. caninum*. Porém, está
15 presente somente nos taquizoítos, tornando-se uma alternativa
16 para o diagnóstico da fase aguda da neosporose. Um estudo
17 experimental mostrou que anticorpos contra este antígeno são
18 detectados em altos níveis no começo da infecção, no entanto
19 diminuem drasticamente após 30 dias do aborto em vacas (HOWE
20 D. K.; CRAWFORD A. C.; LINDSAY D.; SIBLEY L. D. The p29 and
21 p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites
22 are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma*
23 *gondii*, Infection and Immunity, v. 66, p.5322-5328, 1998;
24 DUBEY, J.P., SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five
25 years, Vet. Parasitol, v. 180, p. 90-108, 2011; NISHIKAWA Y.,
26 TRAGOOLPUA K., MAKALA L., XUAN X., NAGASAWA H. *Neospora*
27 *caninum* NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a
28 glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells,
29 Veterinary Parasitology, v. 109, p.191-201, 2011).

30 [021] Ainda que se tenha conhecimento dos principais alvos
31 para o desenvolvimento de testes mais precisos, a utilização
32 do antígeno bruto, ou até mesmo purificado do patógeno, é
33 comumente utilizado, e pode conferir desvantagens às técnicas,
34 como a possibilidade de reações cruzadas e custos mais

1 elevados, por ser necessária a manutenção de linhagens
2 celulares "in vitro". As técnicas moleculares surgem para
3 proporcionar aos testes de diagnóstico, resultados mais
4 eficientes, através da utilização de vetores contendo
5 características singulares, além da utilização de sistemas de
6 expressão de proteínas heterólogas com custos mais baixos, a
7 possibilidade de se utilizar os genes de interesse de forma
8 truncada, mantendo-se somente a sequência do DNA específica do
9 organismo de interesse. Neste contexto, a utilização de
10 proteínas recombinantes para o diagnóstico da neosporose
11 torna-se uma alternativa para se chegar a resultados mais
12 sensíveis e específicos. Analisando o estado da técnica para
13 neoporoose nos últimos 10 anos, é possível afirmar que a maior
14 parte dos trabalhos desenvolvidos, fizeram uso de proteínas
15 recombinantes, destacando-se a utilização dos antígenos NcSRS2
16 e NcSAG1 como as mais utilizadas na confecção de
17 imunodiagnósticos (**ANDREOTTI R., MATOS M. F., GONCALVES K. N.,**
OSHIRO L. M., LIMA-JUNIOR M. S., PAIVA F., LEITE F. L.
Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein
NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies
in sheep, Rev Bras Parasitol Vet, v.18, p.19-22, 2009; BORSUK
S., ANDREOTTI R., LEITE F. P., PINTO L. S., SIMIONATTO S.,
HARTLEBEN C. P., GOETZE M., OSHIRO L. M., MATOS M. F, BERNE
M. E. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of
***Neospora caninum* antibodies in cattle, Vet Parasitol, v.177,**
p. 33-38, 2011; DONG J., OTSUKI T., KATO T., PARK E. Y.
Tracking *Neospora caninum* parasites using chimera monoclonal
antibodies against its surface antigen-related sequences
(rNcSRS2), J Biosci Bioeng, v. 117, p. 351-7, 2014; HIASA J.,
KOHARA J., NISHIMURA M., XUAN X., TOKIMITSU H., NISHIKAWA Y.
ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator
of *Neospora caninum* activation, Vet Parasitol, v. 187, p. 379-
85, 2012; MORAVEJI M., HOSSEINI A., MOGHADDAR N., NAMAVARI M.
M., ESKANDARI M. H. Development of latex agglutination test

1 with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies
2 to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Parasitol*, v. 189, p. 211-
3 7, 2012; SA, G. L., PACHECO D. B., MONTE L. G., SINNOTT F. A.,
4 XAVIER M. A., RIZZI C., BORSUK S., BERNE M. E., ANDREOTTI
5 R., HARTLEBEN C. P. Diagnostic potential of anti-rNcp-43
6 polyclonal antibodies for the detection of *Neospora caninum*,
7 *Curr Microbiol*, v. 68, p. 472-6, 2014; TAKASHIMA, Y., TAKASU,
8 M., YANAGIMOTO, I., HATTORI, N., BATANOVA, T., NISHIKAWA,
9 Y., KITOH K. Prevalence and dynamics of antibodies against
10 NcSAG1 and NcGRA7 antigens of *Neospora caninum* in cattle
11 during the gestation period, *J Vet Med Sci*, v. 75, p. 1413-8,
12 2013; SINNOTT F. A., MONTE L. G., COLLARES T. F., DE MATOS B.
13 M., PACHECO D. B., BORSUK S., ANDREOTTI R., HARTLEBEN C. P.
14 Blocking elisa using recombinant NcSRS2 protein for diagnosing
15 bovine neosporosis, *Curr. Microbiol*, v. 70, p. 429-432, 2015;
16 ZHOU M., CAO S., SEVINC F., SEVINC M., CEYLAN O., LIU M., WANG
17 G., MOUMOUNI P. F., JIRAPATTHARASATE C., SUZUKI H., NISHIKAWA
18 Y., XUAN X. Enzyme-linked immunosorbent assays using
19 recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect *Toxoplasma gondii* and
20 *Neospora caninum*-specific antibodies in domestic animals in
21 Turkey, *J Vet Med Sci*, v. 78, p. 1877-1881, 2017).

22 [022] Como foi abordado, inúmeros trabalhos vêm sendo
23 desenvolvidos para se aperfeiçoar o diagnóstico da neosporose.
24 Porém, as estratégias utilizadas até o momento possuem alguma
25 deficiência, ou necessitam de mais conhecimento para sua
26 utilização. Este fato, associado à falta de um diagnóstico no
27 que tange a sensibilidade e especificidade na detecção da
28 infecção, tanto na sua fase inicial, quanto crônica, ressaltam
29 a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais eficientes e
30 que auxiliem no controle dessa doença.

31 [023] Nos bancos de dados de depósitos de patentes podemos
32 obter um panorama da produção científica e tecnológica
33 relacionado ao estado da arte sobre o diagnóstico para a
34 *Neospora caninum*, e pode-se observar que até o momento, nenhum

1 depósito foi feito utilizando as proteínas NcSRS2 e NcSAG1
2 combinadas, para um diagnóstico mais eficaz da neosporose em
3 ruminantes.

4

5 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

6 [024] A presente invenção refere-se à expressão da
7 sequência gênica de *Neospora caninum* que codifica para o
8 antígeno de superfície NcSAG1, sequência disponível no Genbank
9 (acesso AAD25091.1), em vetor pAE, com promotor induzível por
10 IPTG, e cepa de expressão de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP,
11 tendo sido testada outras cepas de *E. coli* neste estudo, no
12 entanto só a RP foi capaz de expressar a proteína. A rNcSAG1
13 gerada também possui uma cauda contendo 6 histidinas na região
14 amino-terminal, visando facilitar o processo de purificação.
15 Mais especificamente, a invenção compreende a associação da
16 rNcSAG1 com a proteína recombinante NcSRS2, para a produção de
17 um imunoensaio eficaz no diagnóstico da infecção por *N.*
18 *caninum*.

19 [025] Além disso, a presente estratégia apresenta inúmeras
20 vantagens quando comparada a outros produtos, uma vez que esta
21 associação proteica foi escolhida visando unir pontos
22 satisfatórios no que se diz respeito a toda pesquisa já
23 realizada para o controle da neosporose.

24 [026] Neste contexto, a associação de抗ígenos
25 imunogênicos tenderia a melhorar os resultados obtidos nos
26 diagnósticos já descritos anteriormente, além de não
27 apresentarem os resultados falso-positivos, provenientes das
28 reações cruzadas entre outros protozoários aplicomplexos, uma
29 vez que esta invenção se trata de um diagnóstico composto por
30抗ígenos recombinantes truncados.

31

32

33

34

1 **Breve Descrição dos Desenhos**

2 [027] A **figura 1** corresponde a eletroforese em gel de
3 agarose, confirmando a ligação do vetor pAE ao gene *sag1*. Em
4 (1) Marcador 1 Kb plus; (2) pAE circular (\approx 2822 pb); 3: pAE
5 após ser digerido pelas enzimas *EcoRI* e *BamHI*; 4: pAE/NcSAG1
6 circular (\approx 3763 pb); 5: pAE/NcSAG1 digerido com as enzimas de
7 restrição *EcoRI* e *BamHI* (*NcSAG1* \approx 941 pb).

8 [028] A **figura 2** corresponde ao *western blotting*
9 demonstrando a banda reativa da proteína rNcSAG1, expressa em
10 *E. coli* cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP, utilizando anticorpo
11 monoclonal anti- 6xhistidina. Em (1) *E. coli* BL21 Star (DE3)
12 transformada com o plasmídeo pAE/NcSAG1; (2) BL21 pLysE (DE3)
13 transformada com o plasmídeo pAE/NcSAG1; (3) BL21 pLySS (DE3)
14 transformada com o plasmídeo pAE/NcSAG1; (4) BL21 Roseta (DE3)
15 transformada com o plasmídeo pAE/NcSAG1; (5) BL21-CodonPlus
16 (DE3)-RP transformada com o plasmídeo pAE/NcSAG1 e (6)
17 proteína rNcSRS2 como controle (\approx 30 KDa).

18 [029] A **figura 3** corresponde ao *Western blotting*
19 demonstrando a antigenicidade das proteínas rNcSRS2 e rNcSAG1,
20 quando confrontadas com soros de animais naturalmente
21 infectados. Em (MP) Marcador de peso molecular Rainbow™ (GE
22 Healthcare); (1) Proteína rNcSRS2 e soro bovino positivo para
23 toxoplasmose; (2) Proteína rNcSAG1 e soro bovino positivo para
24 toxoplasmose; (3) Proteína rNcSRS2 e pool de soros bovino
25 positivo para neosporose; (4) Proteína rNcSRS2 e pool de soros
26 ovino positivo para neosporose; (5) Proteína rNcSAG1 e pool de
27 soros bovino positivo para neosporose e (6) Proteína rNcSAG1 e
28 pool de soros ovino positivo para neosporose;

29 [030] A **figura 4** representa a análise do ELISA indireto
30 realizado com as proteínas recombinantes (rNcSAG1 e rNcSRS2),
31 de forma individual e em associação, como antígenos, testadas
32 com 106 soros bovinos positivos e 110 soros bovinos negativos
33 para *Neospora caninum*, obtida através do Receiver Operating

1 Characteristic (ROC). Em (A) ELISA-rNcSRS2, (B) ELISA-rNcSAG1
2 e (C) ELISA rNcSRS2/NcSAG1.

3 [031] A **figura 5** representa a análise do ELISA indireto
4 realizado com as proteínas recombinantes (rNcSAG1 e rNcSRS2),
5 de forma individual e em associação, como抗ígenos, testadas
6 com 48 soros ovinos positivos e 106 soros ovinos negativos
7 para *Neospora caninum*, obtida através do Receiver Operating
8 Characteristic (ROC). Em (A) ELISA-rNcSRS2, (B) ELISA-rNcSAG1
9 e (C) ELISA rNcSRS2/NcSAG1.

10 [032] A **figura 6** apresenta a Análise ROC (Receiver
11 operating characteristics) para o ELISA com as proteínas
12 rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os
13 soros bovinos. Em (A) curva ROC para o ELISA com rNcSRS2
14 demonstrando uma área sob a curva de 0,930 (0,887-0,960 com 95%
15 de intervalo de confiança), (B) curva ROC para o ELISA com
16 rNcSAG1 demonstrando uma área sob a curva de 0,901 (0,853-0,937
17 com 95% de intervalo de confiança) e (C) curva ROC para o
18 ELISA com rNcSRS2/rNcSAG1 demonstrando uma área sob a curva de
19 0,981 (0,953-0,995 com 95% de intervalo de confiança).

20 [033] A **figura 7** apresenta a Análise ROC (Receiver
21 operating characteristics) para o ELISA com as proteínas
22 rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma individual e em associação, com os
23 soros ovinos. Em (A) curva ROC para o ELISA com rNcSRS2
24 demonstrando uma área sob a curva de 0,916 (0,861-0,954 com 95%
25 de intervalo de confiança), (B) curva ROC para o ELISA com
26 rNcSAG1 demonstrando uma área sob a curva de 0,897 (0,838-0,940
27 com 95% de intervalo de confiança) e (C) curva ROC para o
28 ELISA com rNcSRS2/rNcSAG1 demonstrando uma área sob a curva de
29 0,999 (0,975-1,000 com 95% de intervalo de confiança).

30 [034] A **figura 8** corresponde aos valores preditivos
31 positivos (losango) e negativos (quadrados) para o ELISA com
32 as proteínas em associação, em níveis de prevalência variáveis
33 de neosporose bovina e ovina. Os valores foram determinados
34 pela análise ROC, baseando-se na sensibilidade e

1 especificidade do imunoensaio. (A) : ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 –
2 Bovinos e (B) : ELISA rNcSRS2/rNcSAG1 – Ovinos.

3 **Descrição detalhada da invenção**

4 [035] Visando propor um diagnóstico satisfatório contra a
5 neosporose bovina e ovina, a presente invenção propõe a
6 associação das proteínas recombinantes rNcSAG1 e rNcSRS2.

7 [036] A presente invenção é descrita em mais detalhes como
8 a seguir: A invenção se utiliza de cepas *Escherichia coli*
9 TOP10, BL21 STAR e BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Para as culturas
10 em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico é adicionado ao
11 meio de cultura. As cepas de *E. coli* são cultivadas em meio
12 Luria Bertani (LB) ou LB contendo 1,5% de ágar bacteriológico
13 por 16 h a 37 °C. Quando necessário o meio LB deve ser
14 acrescido com 100 µg/mL de ampicilina (TOP10 e BL21 STAR) ou
15 cloranfenicol (BL21-CodonPlus (DE3)-RP).

16 [037] Para a expressão das proteínas recombinantes a
17 invenção utiliza da amplificação do gene *NcSRS2* (SEQ ID
18 NO:5) que é realizada utilizando os primers Foward e Reverse
19 conforme descritos na SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7; E através de
20 sequência disponível no Genbank (acesso AAD25091.1) um gene
21 sintético (SEQ ID NO:3) contendo códons preferenciais para
22 expressão da proteína NcSAG1 foi sintetizada.

23 [038] O domínio antigênico de *NcSRS2*, é clonado no vetor
24 pET100/D-TOP. O plasmídeo recombinante (pET100/D-
25 TOPO/NcSRS2), contendo a CDS correspondente a proteína rNcSRS2
26 (SEQ ID NO:8) foi usado para a transformação de *Escherichia*
27 *coli* BL21 Star. A seguir, as células de *E. coli* em fase
28 exponencial de crescimento foram tratadas com 1 mM/mL de
29 isopropil ~D-thiogalactoside (IPTG) por 3 h a 37 °C para
30 induzir a expressão da NcSRS2 recombinante. A expressão da
31 proteína recombinante NcSRS2 foi confirmada por eletroforese
32 em SDS-PAGE e Western blotting usando anticorpo monoclonal
33 anti6xhistidina conjugado com a enzima peroxidase. As bandas
34 foram reveladas usando solução substrato cromógena contendo 6

1 mg de 3,3'diaminobenzidine, 0,03 % de sulfato de níquel, 50 mM
2 Tris-HCl, pH 8,0 e 0,03 % de peróxido de hidrogênio. NcSRS2
3 recombinante foi solubilizada em tampão contendo 0, 2 % de N-
4 lauroyl sarcosine por 72 h a 4 °C.

5 [039] A sequência do gene NcSAG1 (SEQ ID NO:1) é utilizada
6 para se desenhar um gene sintético (SEQ ID NO:3), e este é
7 clonado nos sítios EcoRI e BamHI do vetor de expressão pAE.
8 Para isso, pAE e NcSAG1 são digeridos com as enzimas de
9 restrição EcoRI e BamHI (FERMENTAS), conforme recomendação do
10 fabricante e posteriormente, ligados com auxílio da enzima T4
11 DNA ligase (FERMENTAS), gerando como produtos os plasmídeos
12 recombinantes pAE/NcSAG1 (**Figura 1**), contendo a CDS
13 correspondente a proteína rNcSAG1 (SEQ ID NO:2). Os produtos
14 da ligação são transformados por eletroporação em células de
15 *E. coli* TOP 10 competentes, e cultivados em meio LB com 100
16 µg/mL de ampicilina por 16 h a 37 °C. Uma triagem rápida por
17 lise de colônia com fenol clorofórmio (v/v), seguida de
18 digestão com enzimas de restrição é realizada para
19 caracterização dos clones recombinantes.

20 [040] Ainda, para a expressão da proteína recombinante
21 NcSAG1, bactérias *E. coli*, de diferentes cepas foram
22 utilizadas (*E. coli* BL21 Star (DE3), BL21 pLysE (DE3), BL21
23 pLysS (DE3), BL21 Roseta (DE3) e BL21-CodonPlus (DE3)-RP) e
24 transformadas por choque térmico para inserção do vetor
25 recombinante pAE/NcSAG1. A indução da expressão se dá pela
26 adição de 1 mM de IPTG ao cultivo mantido sob agitação orbital
27 a 37 °C por 3 h. A expressão da proteína recombinante é
28 confirmada através da técnica de *Western blotting* (somente a
29 cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP foi capaz de expressar a
30 proteína) (**SAMBROOK J., RUSSEL D.W. Molecular Cloning, A**
31 **Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory**
32 **Press, New York, 2001**) utilizando anticorpo monoclonal anti-
33 6xhistag conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich). Para isso,
34 as amostras contendo rNcSAG1 são misturadas com tampão (100-mM

1 Tris-HCl pH 6.8, 100-mM 2-mercaptopoethanol, 4% SDS, 0.2%
2 bromophenol blue, 20% glycerol) sob condições redutoras,
3 aquecidas a 100 °C durante 10 min e, submetidas a eletroforese
4 em gel SDS-PAGE 12%. Posteriormente é realizada a
5 transferência para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare),
6 que após 2 h, é bloqueada com PBS contendo 5% de leite
7 desnatado durante 1 h a 37 °C. Em seguida, adiciona-se anti-
8 6Xhistag (Sigma Aldrich) à membrana na diluição de 1:4000 a 37
9 °C durante 1 h. As membranas são lavadas com PBS tween 0,05%
10 (PBS-T), e incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado com
11 peroxidase diluído (Sigma Aldrich) a 1:4000 em PBS-T a 37 °C
12 durante 1 h. A banda reativa é revelada utilizando 3,3'-
13 diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. A identidade da proteína de
14 superfície rNcSAG1 (SEQ ID NO:4) recombinante, pode ser
15 confirmada, conforme visualizado na **Figura 2** através da banda
16 reativa com peso molecular aproximados de 30 kDa.

17 [041] A purificação das proteínas NcSRS2 e NcSAG1 é
18 realizada por cromatografia de afinidade em coluna de
19 sepharose (HisTrap™; GE Healthcare), carregada com níquel, uma
20 vez que as proteínas possuem em sua extremidade amino terminal
21 uma sequência de 6 aminoácidos histidina. A pureza das mesmas
22 é determinada através de um SDS-PAGE 12% e a concentração
23 determinada pelo kit BCA (Pierce).

24 [042] As proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1 foram
25 consideradas antigênicas, uma vez que os anticorpos presentes
26 nos soros dos animais positivos para neosporose através de IFI
27 (bovinos e ovinos) foram capazes de reconhecer as proteínas
28 através de western blotting (**Figura 3**). Foi utilizado um pool
29 de soros bovinos positivos para *T. gondii*, e não apresentou
30 reação frente às duas proteínas, podendo-se concluir que
31 ambas, nas suas formas truncadas, são específicas do
32 protozoário *N. caninum*.

1 [043] A presente invenção poderá ser mais bem
2 compreendida através do exemplo que se segue, porém esta não é
3 limitada ao referido exemplo.

4 **EXEMPLO - IMUNOENSAIO DE ELISA INDIRETO UTILIZANDO**
5 **PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE**

6 [044] Este exemplo ilustra a análise de imunorreatividade
7 das proteínas recombinantes rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma
8 individual ou em associação, aos soros de animais infectados
9 com *Neospora caninum* e seu potencial na utilização em
10 imunodiagnósticos.

11 [045] Neste exemplo foi utilizado um total de 370 amostras
12 de soros, disponíveis no banco de soros do Laboratório de
13 Biotecnologia infecto-parasitária, da Universidade Federal de
14 Pelotas. Desses, 216 soros eram de bovinos (106 amostras
15 positivas e 110 amostras negativas) e 154 soros de ovinos (48
16 amostras positivas e 106 amostras negativas). Todos os soros
17 utilizados foram coletados de rebanhos que apresentavam algum
18 tipo de problemas reprodutivos. A soro-positividade ou
19 negatividade das amostras foi previamente confirmadas pela
20 técnica de IFI, sendo considerados positivos os soros que
21 apresentaram títulos superiores a 100 em ovinos, e 200 em
22 bovinos (**Pare et al., 1995**). Também utilizamos soro de
23 terneiro recém-nascido e soro de cordeiro recém-nascido, de
24 rebanhos que não apresentavam problemas reprodutivos, sendo
25 denominados de soro normal de terneiro (SNT) e soro normal de
26 cordeiro (SNC). Os soros das progenitoras foram analisados por
27 IFI, conforme citado no parágrafo anterior, sendo a
28 negatividade para neosporose, o critério para coleta do soro
29 do terneiro e do cordeiro.

30 [046] Para o desenvolvimento de um novo método de
31 diagnóstico por ELISA indireto, cada proteína recombinante
32 (rNcSAG1 e rNcSRS2) foi testada individualmente e em
33 associação. De acordo com as padronizações, foram utilizadas
34 100 ng de cada proteína no ensaio individual e 50ng de cada

1 proteína no ensaio em associação, e a diluição de soro 1:100
2 nos ensaios individuais e em associação, realizados de acordo
3 com a distribuição abaixo:

4 Estratégia I: rNcSRS2

5 Estratégia II: rNcSAG1

6 Estratégia III: rNcSRS2/rNcSAG1

7 [047] Inicialmente as placas foram sensibilizadas com as
8 proteínas diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6,
9 100ng de proteína/poço (Estratégia I e II) e 50ng de cada
10 proteína/poço (Estratégia III), em um volume de 100
11 µL/cavidade, testados em duplicita, por 16 h, a 4 °C. Após
12 lavagens com PBS contendo Twen 20% (PBS-T), as placas foram
13 acondicionadas a -20 °C até a sua utilização. O bloqueio das
14 placas foi feito com PBS-T acrescido de 1% de Soro Fetal
15 Bovino (SFB), por 2 h a 37 °C e posterior, as placas foram
16 lavadas 5 vezes com PBS-T. Os soros positivos e negativos, de
17 bovinos e ovinos, foram adicionados separadamente, diluídos
18 1:100 em PBS-T+1% de SFB, por 1h a 37 °C. Como controles
19 negativos, utilizamos soro normal de terneiro (SNT) e soro
20 normal de cordeiro (SNC). Após a incubação e posterior
21 lavagens, foi adicionado a placa o anticorpo secundário anti-
22 bovino conjugado com peroxidase (1:4000) (Sigma-Aldrich) e o
23 anticorpo secundário anti-ovino conjugado com peroxidase
24 (1:4000) (Sigma-Aldrich), respectivamente onde foi adicionado
25 o soro relativo à espécie, diluídos em PBS-T+1% de SFB, por
26 1h a 37 °C. Para a reação colorimétrica uma solução contendo
27 0,01 g de ortofenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 10 mL de
28 tampão citrato-fosfato pH=4,0 e 50 µL de H₂O₂, foi adicionado a
29 placa. Após interrupção da reação com H₂SO₄ 4 N, a absorbância
30 foi determinada numa faixa de comprimento de onda entre 450 e
31 492 nm em leitor de microplaca (Microplate reader MR-96A,
32 Mindray).

33 [048] Para avaliar a especificidade e a sensibilidade do
34 teste ELISA os dados obtidos na leitura foram submetidos à

1 análise ROC (Receiver Operating Characteristic) utilizando o
2 software MedCalc estatística (versão 10.3.0). A avaliação foi
3 realizada com o teste das proteínas individuais e associadas,
4 para as duas espécies testadas, gerando ao final 6 curvas ROC
5 referentes ao dados analisados.

6 [049] A **Figura 4** indica a distribuição dos resultados
7 individuais (**figuras 4A e 4B**) e em associação (**figura 4C**) em
8 relação aos soros bovinos, e a **Figura 5** indica a distribuição
9 dos resultados individuais (**figuras 5A e 5B**) e em associação
10 (**figura 5C**) em relação aos soros ovinos. A área sob a curva
11 foi usada para determinar a acurácia dos imunoensaios (**Figuras**
12 **6 e 7**), obtendo-se como resultados para bovinos os valores de
13 0,930, 0,901 e 0,981 e para ovinos os valores 0,916, 0,897 e
14 0,999 para a estratégia I, II e III, respectivamente para os
15 dois testes.

16 [050] Os valores dos pontos de corte para bovinos foram de
17 >0,59 para rNcSRS2, >0,64 para rNcSAG1 e >0,41 para
18 rNcSAG1/rNcSRS2. A rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSAG1/rNcSRS2
19 mostraram 91,5%, 84,9% e 98,1% de sensibilidade e, 96,4%,
20 97,3% e 99,1% de especificidade, respectivamente.

21 [051] Os valores dos pontos de corte para ovinos foram de
22 >0,253 para rNcSRS2, >0,23 para rNcSAG1 e >0,20 para
23 rNcSAG1/rNcSRS2. A rNcSRS2, rNcSAG1 e rNcSAG1/rNcSRS2
24 mostraram 89,6%, 89,6% e 100% de sensibilidade e, 96,3%, 92,6%
25 e 97,2% de especificidade, respectivamente.

26 [052] Através destes resultados podemos então inferir que
27 a associação das proteínas recombinantes rNcSAG1 e rNcSRS2
28 apresentou resultados promissores, superando
29 significativamente o valor da especificidade de 88,7%
30 apresentado no ensaio para bovinos realizado por nosso próprio
31 grupo de pesquisa utilizando a rNcSRS2 como único antígeno em
32 um ELISA de bloqueio (**SINNOTT F. A., MONTE L. G., COLLARES T.**
33 **F., DE MATOS B. M., PACHECO D. B., BORSUK S., ANDREOTTI R.,**
34 **HARTLEBEN C. P. Blocking elisa using recombinant ncsrs2**

1 protein for diagnosing bovine neosporosis, *Curr. Microbiol.*,
2 v. 70, p. 429–432, 2014). Ainda para bovinos, DONG et al
3 (2012) associaram três proteínas para o desenvolvimento de um
4 ELISA (NcSRS2, NcGRA7 e NcSAG1). No entanto, obteveram uma
5 sensibilidade de 91,7%, e a comparação dos resultados obtidos
6 foram feitas através de um kit comercial no formato ELISA, e
7 não com a técnica padrão. FERNANDES-PINHEIRO et al. (2015)
8 descreveram um ELISA indireto para ovinos, utilizando a
9 proteína NcSR2, com uma especificidade de 94,5%, comparado
10 com 97,2% obtidos no nosso trabalho com as proteínas
11 associadas, demonstrando que a associação das proteínas torna
12 o diagnóstico mais preciso (DONG J., OTSUKI T., KATO T., PARK
13 E.Y. Development of a diagnostic method for neosporosis in
14 cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins, *BMC*
15 *Biotechnol.*, v. 12, 2012; FERNANDES-PINHEIRO A., BORSUK S.,
16 BERNE M. E. A., PINTO L. S., ANDREOTTI R., ROOS T., ROLOFF B.
17 C., LEITE, F. P L. Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora*
18 *caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing
19 neosporosis in sheep and dogs, *Electron. Braz. J. Vet.*
20 *Parasitol. Jaboticabal*, v. 24, p. 148–154, 2015).

21 [053] Baseado na sensibilidade e na especificidade do
22 ELISA rNcSRS2/rNcSAG1, os valores preditivos negativos e
23 positivos do ensaio com as proteínas associadas variaram de
24 85,2% a 99,7% e de 92,3% a 99,8% respectivamente para bovinos
25 (**Figura 8A**), e para ovinos os valores preditivos positivos
26 variaram de 79,8% a 99,6%, não houve variação dos negativos,
27 uma vez que 100% dos soros foram compatíveis com o resultado
28 da IFI (**Figura 8B**), os valores preditivos obtidos dependem
29 da prevalência da neosporose exibida em uma área específica.

30

31

32

33

34

REIVINDICAÇÕES

3 1. ASSOCIAÇÃO DE PROTEINAS RECOMBINANTES DE *Neospora*
4 *caninum*, caracterizadas por compreenderem proteínas de
5 superfície celular, sendo a proteína NcSAG1 (*surface antigen-*
6 1) (SEQ ID NO:4), constituída por componentes essenciais para
7 a virulência do parasito, e a proteína NcSRS2 (*SAG1-related*
8 sequence 2) (SEQ ID NO:9), sendo relacionada ao processo de
9 ligação e entrada na célula hospedeira, ambas as proteínas
10 expressas em cepas de *Escherichia coli*, para fins de
11 utilização em testes imunodiagnósticos;

12 2. ENSAIO DE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA
13 NEOSPOROSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por
14 compreender a utilização das proteínas recombinantes
15 purificadas rNcSRS2 e rNcSAG1 na concentração de 25 a 100ng de
16 proteína por cavidade, em associação para a composição do
17 imunoensaio;

18 3. ENSAIO DE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA
19 NEOSPOROSE, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado
20 pela detecção da enfermidade em ruminantes;

21 4. ENSAIO DE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA
22 NEOSPOROSE, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado
23 pela deteção da enfermidade em mamíferos.

24

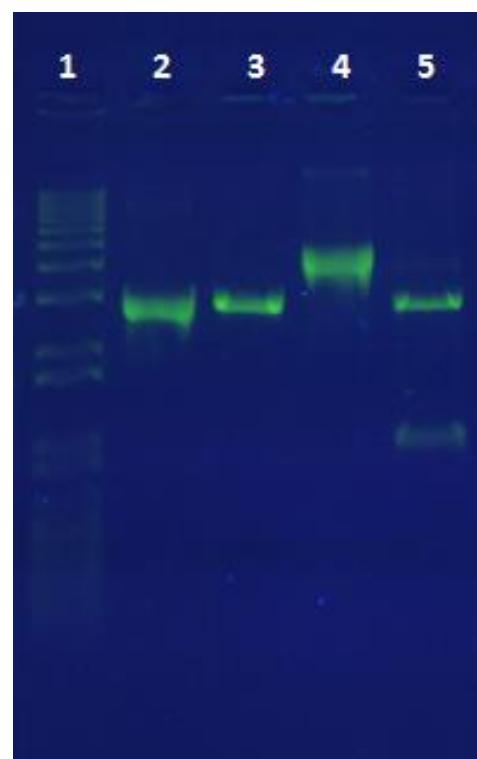
1 ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Neospora caninum* NO
2 DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA A NEOSPOROSE

3

4 **FIGURAS**

5

6 **Figura 1.**



1 **Figura 2.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

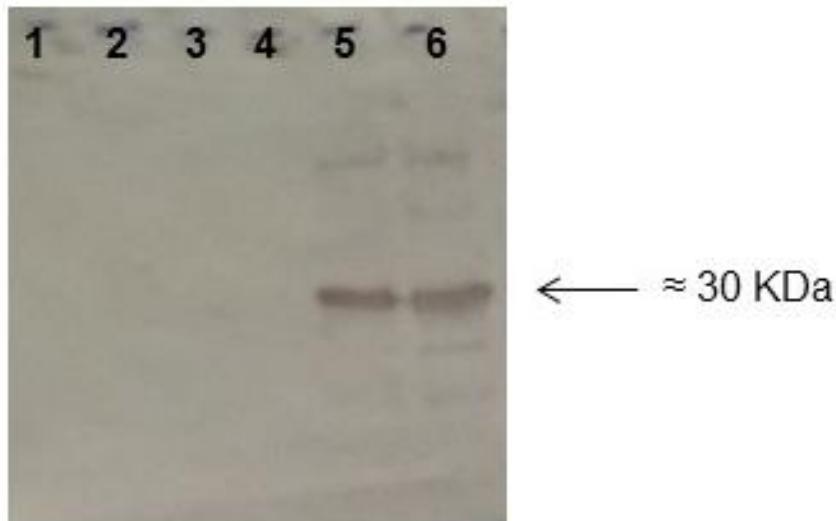
23

24

25

26

27



1 **Figura 3.**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

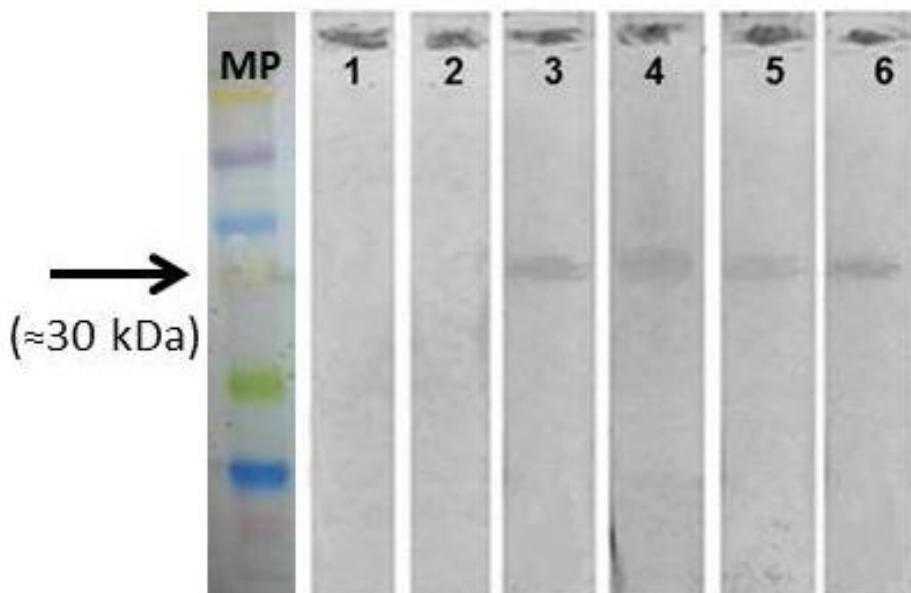
23

24

25

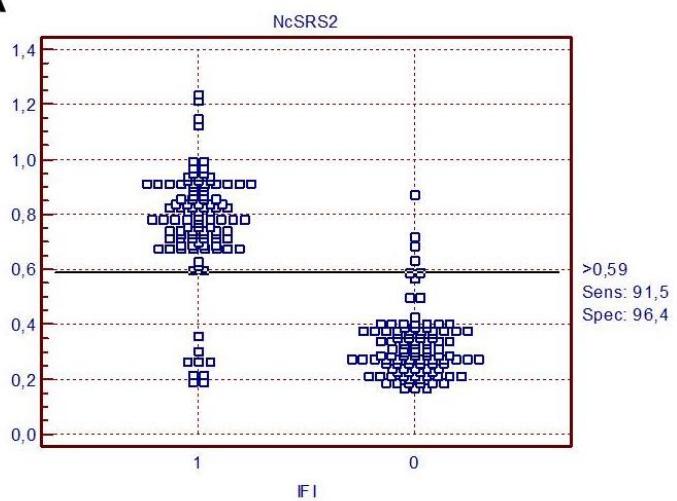
26

27



1 **Figura 4.**

2

A

3

4

5

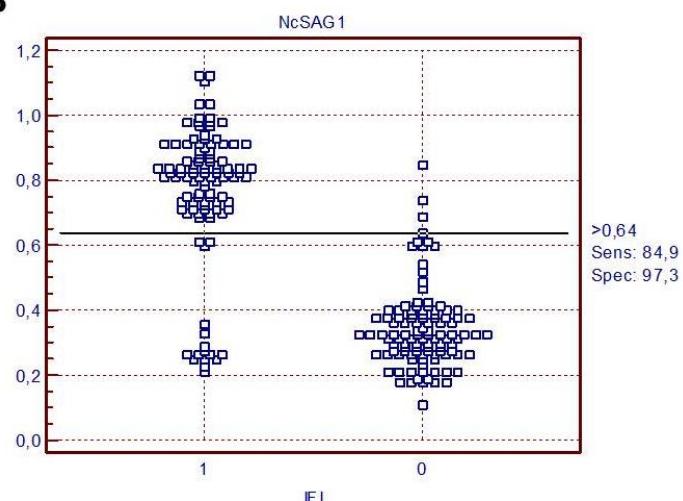
6

7

8

9

10

B

11

12

13

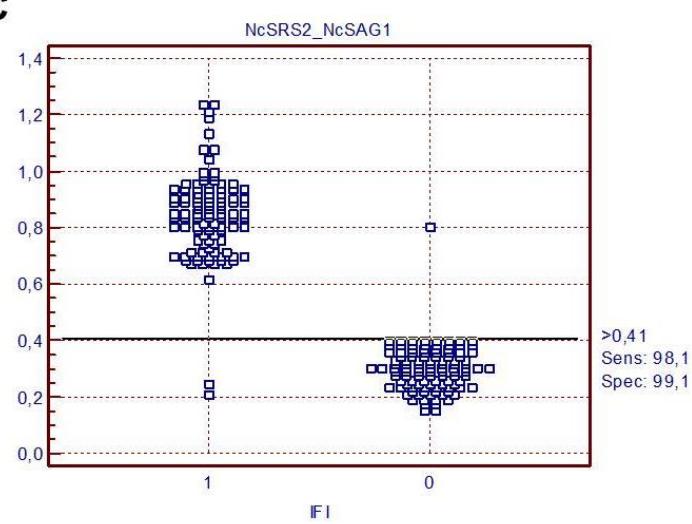
14

15

16

17

18

C

19

20

21

22

23

24

25

26

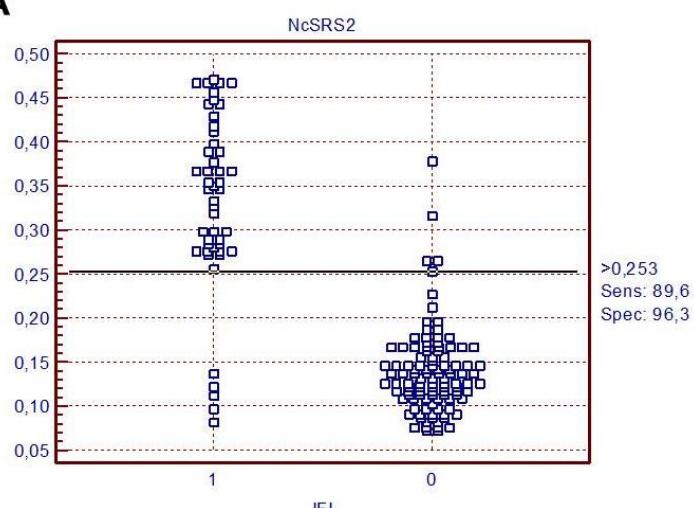
27

1 **Figura 5.**

2

A

3

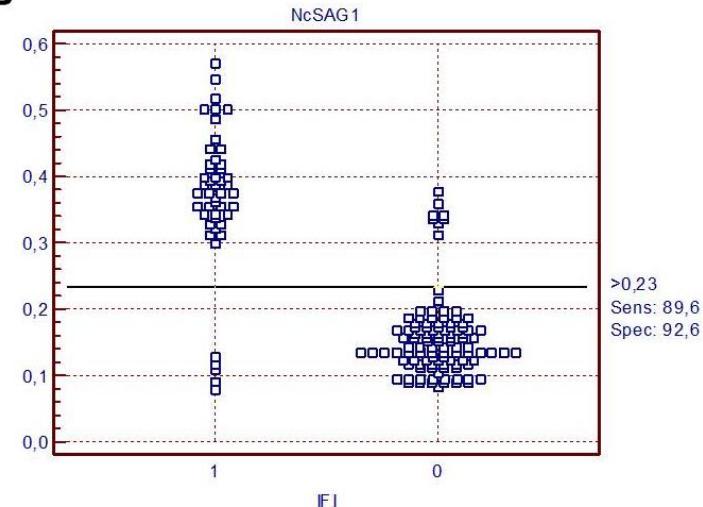


10

11

B

12



13

14

15

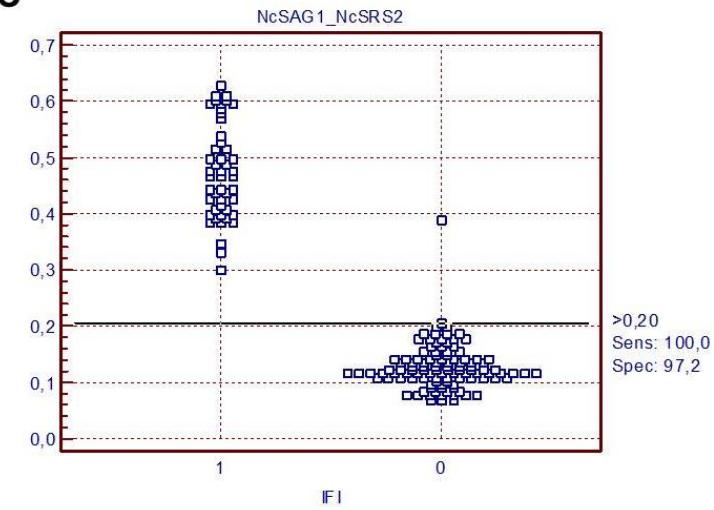
16

17

18

C

19



20

21

22

23

24

25

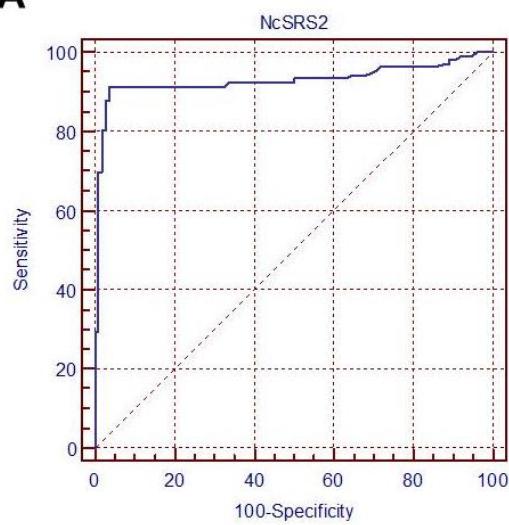
26

27

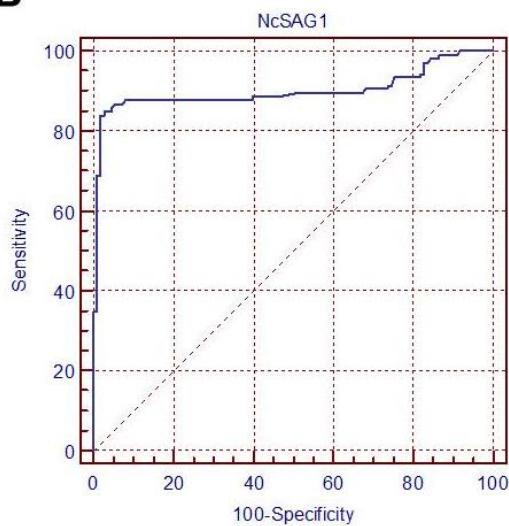
1 **Figura 6.**

2

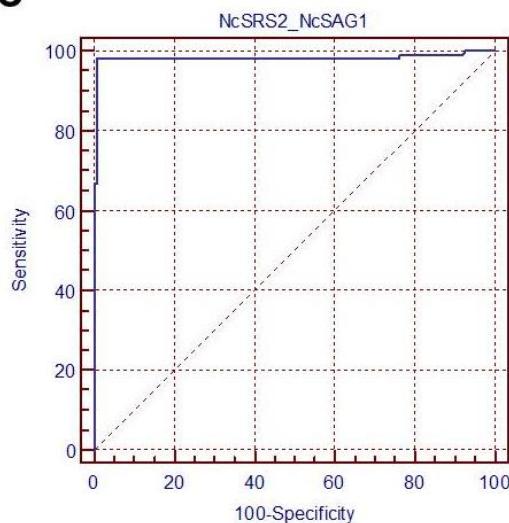
A



B

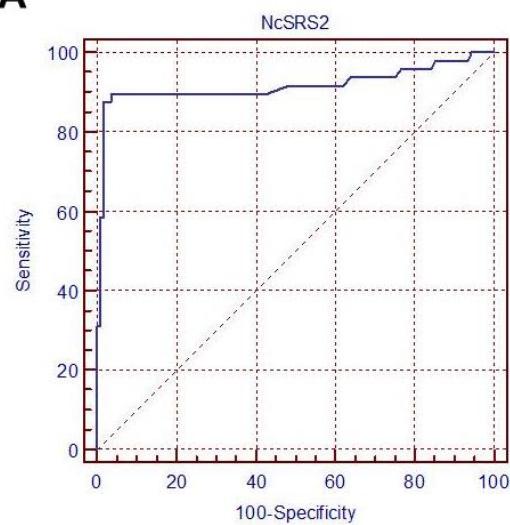
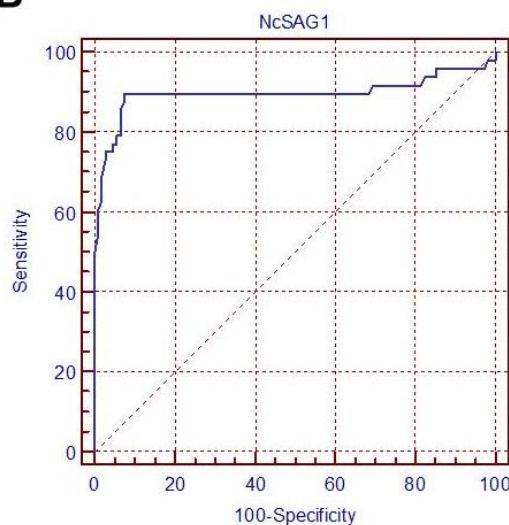
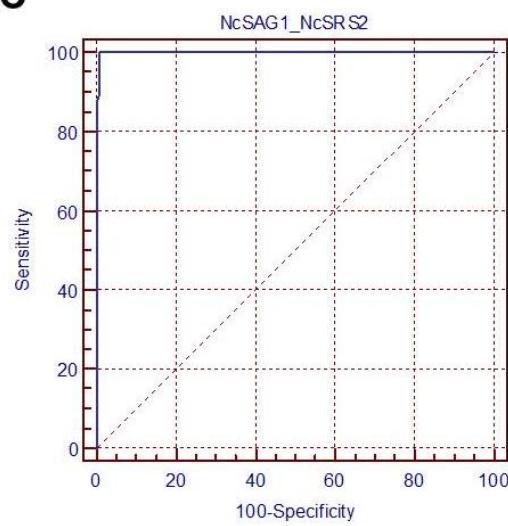


C



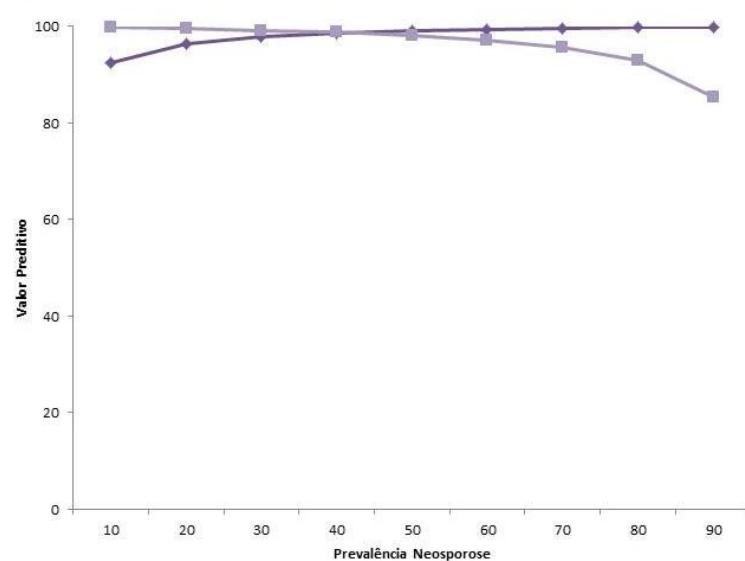
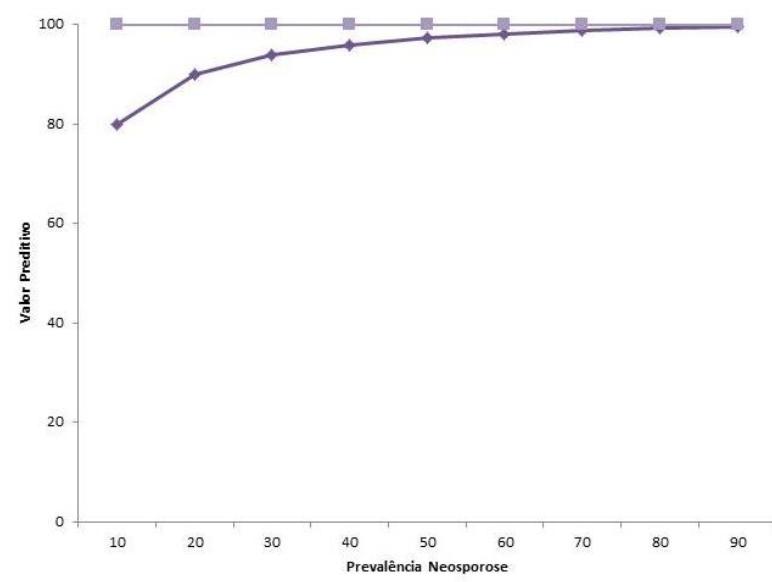
1 **Figura 7.**

2

A**B****C**

1 **Figura 8.**

2

A**B**

1 ASSOCIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Neospora caninum* NO
2 DESENVOLVIMENTO DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA A NEOSPOROSE
3

4 **SEQUÊNCIAS**

5

6

7 SEQ ID NO: 1

8 Sequência do gene NcSAG1

9

10

11 CTTGTATCACAGGTGCCTTGTGTCGTACATAAACATTGTTGATTGTAGTCTAGTCACACCG
12 CACTCGTTCATCACTGGCGCTTTGTTATTCAATCGAATATGTTCTCGGGCAGTGAGAC
13 GCGCCGTCTCGGTGGGTGTGTTGCCGCCGCACTGGTGGCGTTCTTGACTGTGGAAC
14 ATGGCATCAGAAAAATCACCTCTACTTGTCAATCAAGTTGTCACCTGTGACAACGAAGAGAA
15 ATCATCAGTTGCCGTCTACTATCACCGAAGCTGAACCACATCACGCTCAAGTGCCCTGACA
16 ATTGACCGCCGTGCCGCTGCTCTGGTTATCCAACAAACAGGACCGTCTGCCGGCGGAG
17 TCCGGAGGTCAAACATTGTACAGGCAAGGAGATACCGTTGAAAGCCTGCTTCCCAGGGCAA
18 CGATAGCTGGTGGTCAGGTGTTGATATCAAGACTGGCGTTAAGCTCACAATTCTGAAGCGA
19 GCTTCCCCACAACATCCAAGTCGTTGACGTCGGCTCGTCAGCAGTGATGCCAGCAAGAGT
20 TGTATGGTCACAGTCACAGTGCCACCCAGAGCCTCATCGCTTGTCAACGGTGTGCAATGTG
21 CTCTTACGGTGCAAACGAAACTCTCGGCCCTATCACATTGTCCGAGGGCGGATCTTCTACGA
22 TGACCCTCGTTGCCGACGGATGGGAAGCCAGTTCTGATCCTAAGCAGGTTGTTCT
23 GGGACGACCGTCAAGGATTGTAAAGCAAACCGTTCACTGATGTTCCAAAATTCAAGTGC
24 TGATTGGTGGCAGGGAAAACCGACACTAAGGATGGTGCAAAACTAACGATCAAGAAAGGTG
25 CATTTCCTCAAAGGAGGAAAAGTTACTCTGGGTGCAAGAGCGTATCGAGTCCGGAGGTT
26 TACTGTACTGTGCAGGTGGAGGCAGAGCGCGAGTGCAGGGATCAAGTCGTCGGCTGAAAA
27 TGTTGGTCGCGTTCCCTTTCGCTGTAACAATTGGACTCGTAGGCTCGATAGCGGCTGGCG
28 TCGCGTGAGTGACAATCGTTCTGCTGCCATTCAAAAAATAATGCAAGACATGTTCGCGTT
29 CGTCATGTGTCTTATCATA

30

31

32

1 SEQ ID NO: 2
2 CDS NcSAG1
3
4
5 ATGTTTCCTCGGGCAGTGAGACGCCGCTCGGTGGTGTGTTGCCGCCGCACGGT
6 GGC GTTCTTGACTGTGGA ACTATGGCATCAGAAAAATCACCTCTACTGTCAATCAAGTTG
7 TCACCTGTGACAACGAAGAGAAATCATCAGTGCCGTCTACTATCACCGAAGCTGAACCAC
8 ATCACGCTCAAGTGCCCTGACAATTGACCGCCGTGCCCGCTGCTCTGGTTATCCAACAAA
9 CAGGACCGTCTGCCCGGGAGTCCGGAGGTCAAACATTGTACAGGCAAGGAGATAACCGTTGG
10 AAAGCCTGCTTCCC GG GG CAAACGATAGCTGGTGGTCAGGTGTTGATATCAAGACTGGCGTT
11 AAGCTCACAATT CCTG AAGCGAGCTCCCCACAACATCCAAGTCGTCGACGTCGGCTGCGT
12 CAGCAGTGATGCCAGCAAGAGTTGTATGGTCACAGTCACAGTGCCACCCAGAGCCTCATCGC
13 TTGTCAACGGTGTGCAATGTGCTCTACGGTCAAACGAAACTCTCGGCCCTATCACATTG
14 TCCGAGGGCGGATCTTCTACGATGACCTCGTTGCCACGGATGGGAAGCCAGTTCCCTCC
15 TGATCCTAACGAGTTGCTGGGACGACCGTCAAGGATTGTAAAGCAAACCGTTCACTG
16 ATGTTTCCAAAATTCAAGTGCATT CCTCAAAGGAGGAAAGTTACTCTGGTGCAA
17 AAACTAACGATCAAGAAAGGTGCATT CCTCAAAGGAGGAAAGTTACTCTGGTGCAA
18 GAGCGTATCGAGTCCGGAGGTTACTGTACTGTGCAGGTGGAGGCAGAGCGCGCAGTGCAG
19 GGATCAAGTCGTCGGCTGAAAATGTTGGTCGCGTTCCCTT CGCTGTAACAATTGGACTC
20 GTAGGCTCGATAGCGGCTGGCGTCGCGTGA
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 SEQ ID NO: 3
2 Gene sintético NcSAG1
3
4
5 GGATCCATGTTCCTCGGGCAGTGAGACGCGCCGTCTCGGTGGTGTTCGCCGCGCCC
6 ACTGGTGGCGTTCTTGACTGTGGA~~ACT~~TGGCATCAGAAAAATCACCTCTACTTGTCAATC
7 AAGTTGTCACCTGTGACAACGAAGAGAA~~AT~~CATCAGTTGCCGT~~CT~~ACTATCACCGAAGCTG
8 AAC~~ACC~~ACATCACGCTCAAGTGCCCTGACAATTGACCGCCGTGCCGCTGCTCTGGTTATCC
9 AACAAACAGGACCGTCTGCCCGGGAGTCCGGAGGTCAA~~ACT~~TGTACAGGCAAGGAGATA
10 CGTTGGAAAGCCTGCTTCCC~~GGGG~~CAAACGATAGCTGGTGGTCAGGTGTTGATATCAAGACT
11 GGC~~GTT~~AAGCTCACAATT~~CCT~~GAAGCGAGCT~~CCCC~~ACAACATCCAAGTCGTTGACGTCGG
12 CTGCGTCAGCAGTGATGCCAGCAAGAG~~TT~~TATGGTCACAGTCACAGTGCCACCCAGAGCCT
13 CATCGCTTGTCAACGGTGT~~CG~~CAATGTGCTCTACGGTGCAAACGAA~~ACT~~CTCGGCCCTATC
14 ACATTGTCCGAGGGCGGATCTT~~CTACGATGAC~~CC~~CTCG~~TTG~~GG~~GCACGGATGGGAAGCCAGT
15 TCCTCCTGATCCTAACGAG~~TTGTT~~CTGGGACGACCGTCAA~~GG~~ATTGTAAAGCAAACCGT
16 TCACTGATGTTTCCC~~AA~~ATT~~CAGTGCTGATTGGTGG~~CAGGGAAACCCGACACTAAGGAT
17 GGTGCAAAACTAACGATCAAGAAAGGTGCATT~~CC~~AAAGGAGGAAAGTTACTCTTGG
18 GTGCAAGAGCGTATCGAGTCCGGAGGTTACTGTACTGTGCAGGTGGAGGCAGAGCGCGCGA
19 GTGCAGGGATCAAGTCGT~~GG~~CTGAAAATGTTGGTC~~CG~~GT~~TT~~CC~~CT~~TT~~CG~~CTGTAACAATT
20 GGACTCGTAGGCTCGATAGCGGCTGGCGTC~~CG~~GTGAGAATT
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

1 SEQ ID NO: 4
2 Sequência da proteína NcSAG1
3
4
5 GGATCCMFPRAVRRAVSGVFAAPALVAFFDCGTMASEKSPLL VNQVVTC DNEEKSS VAVLL
6 SPKLNHITLKCPDNSTAVPAALGYPTNRTVCPAESGGQTCTGKEIPLESLLPGANDSWWSGV
7 DIKTGVKLTIPEASFPTTSKSFDVGCVSSDASKSCMVTVTVP PRASSLVNGVAMCSYGANET
8 LGPITLSEGGSSTM TLVCGTDGKPVPPDPKQVC SGTTVKDCAKPFTDVFPKFSADWWQGKP
9 DTKDGAKLT IKKGAFPPKEEKFTLGCKSVSSPEVYCTVQVEAERASAGIKSSAENVGRVSLF
10 AVTIGLVGSIAAGVATGAGAATT C
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

1 SEQ ID NO: 5
2 Sequência do gene NcSRS2
3
4
5 ATGGCAAGAGCAAGCAGAATGAAGCAATATCATGGAGAGCTCAGATCCAAGGTCCGGAAGTT
6 GATGGCGGTTGCTTGGGTGGAGTTTGCTAATTTCAGGTGGCGGAGCTGTCGCTGGTGAGC
7 CGTTCGAGGGCCTCTCGTCGGTCTTAACCTCGGGAGAGATGAAACCGGGACGGAACA
8 GCCGCTACCAATTCCGTCGCAACGTGTCAGGGAAAAATGGAAGCGCAACTGCCCAACTCC
9 TGCTACGTTGACGCTATCAAAGAGTTCCCTCACCGCTGAGGTAAAGTGCTTAGATGAAACAA
10 ACACACCCGCACCGAACGGGCTGGACAATGTCTGTCGCCAAAACGACGGAGGATATTGTG
11 GAAGATAGTGTTCATGACTGCAAGTTGGTTCGGACACAGGGCGGACGGTACGCTGGAA
12 AACGCTCCTCGGGCAAACCAAAAGATACTGGACAGAAAAACATATCGGACAGTGACA
13 CAGGCACCGGGACCGCACGGATGCTCAAGCTAAACGAGGCAGACCTCCCTGAACCGACAAG
14 ACATTCTCGTTGGCTGCAAAAAACAAGCAGGTGCCACGCCAACCGTCGTGCAAAGTGAC
15 AGTGAACGTGAATGCCGACCCCTCGTCGGTTGACGACAAAAACGTTGTCACCTGCGCATA
16 GCGAGGACAGCAACCAGAAAGCCGTGGAAGTGGAGATGTCACAAGACAAAAACACTCTCACC
17 ATTGACTGTGGGAAGGACGGATCGATGCAGCCTGCTGAATTCACATCTCAGTACTGCTCCCC
18 CGAGGGAGACACGTTGGAGGAATGCTCCAAGGCGAACTACTCTGATATTCTCCACTTTG
19 AAACCAGCTGGTGGACCGAACGCGGAGAACGACAGTTCCCGGCTGTGTTGACCACCGAAG
20 GCCGACTTCCCAGGTGAAGACCAGCGCCTCCTCTAGGCTGTGCTCTAAATCAACAGCTGC
21 GGAAACGCCAGGCAAGGCATCCGGCCGTCCGGTCCCGCAGAACCGAACATCCTGTCGGG
22 TTGTTGTTACTGTCAAGGCAGCGAGCTCGGCCTCGTGCATCATTCACCTCGCAAAGTGTA
23 GCTGCGACCGCTGGAGCAACTGTTCTACCAGCGCTGTTGGCTGGTTCGTTCAA
24
25
26
27
28
29
30
31

1 SEQ ID NO: 6
2 Amplificação do gene NcSRS2: Primer Foward
3
4
5 5' -CACCAAAGAGTGGGTGACTGG
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

1 SEQ ID NO: 7
2 Amplificação do gene NcSRS2: Primer Reverse
3
4
5 5' -GGTAAGCTTGCATCTCCTCTAACAC-3'
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

1 SEQ ID NO: 8
2 CDS NcSRS2
3
4
5 CACCAAAGAGTGGGTGACTGGAACCTTCAACAGGAAATAAGGATTACAATTCCCGACGAGC
6 ACTACCCAGCTACGTCGAAAGCTTCCGTGTTGTAAGGCGGTAAAAATGTTGTTG
7 CTCAATGTGTATGTTCAGAGTAGGAAATCAGAGGTGATCGGACAGGTGGCGATTGTGCTTA
8 TAGTTCCAACGTACGTCTCGTCCAATCACTGTGAATCCAGAAAACAACGGAGTGACATTAA
9 TTTGC GGACCAGACGGGAAGGC GTTCCC GGATGATTACATGAACCACCATTGTACGGA ACTA
10 GACGAATGTAAAGAACGCCCTTATTCCGCCGTGTTCCCTGGGTTCTCCAGTAGTTTGGAC
11 TGGAGAAGCTTCCGGCGTAGCCGGGGCGACACTGACCATTCCAAGGACCAGTTCTCGA
12 CAGCACAGACCATCTATTGGGCTGCACTGGTCACCCGGATGATAAACAGGTACCTGTGTG
13 GTTCCAGTAAATATAGAAGAAGTTGCAAAACCAGCAGGGCCGGATCGAACCCAGGTGGTGG
14 TTCGCAACCGGACCAATCCTCGGAGAACCGCGACGGGAACAGGTAAACAAAGGCAAACCTC
15 CCACTGGCGGATCCGGGGAGCAACAACTGGAAAACAAAATGCATCCAAAACGCGAAGGAC
16 AAGGGGGAAACAGGAGGGAGAGAACGGCGATTCCCCGTGTTAAGAGGAGATGCAAAGCTTAC
17 C
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

1 SEQ ID NO: 9
2 Sequência da proteína NcSRS2
3
4
5 HQRVGDWNSSTGNKDYNNSRRALPSYVESFPCWLGGKCLFAQCVCSEGIRGDRTGGALCLFQR
6 TSASNHCESRKQRS DINL RTRREGVPGLHEPPLYGTRRMRTPLFRRVSWVLQFLDWRSFRS
7 RGDTDHSQGPVSFDSTDHLFGLHWSPGTGHLCSSKYRRSCKTSRGRIEPRWWFATGPILGE
8 TRRG TGKQRQTSHWRIRRSNNWTKCIPKREGQGGNRRERRFPRVKRRCKAY
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

1
2
3
4
5

6 Conclusões Gerais

7

- 8 • As proteínas rNcRSR2 e rNcSG1 foram consideradas específicas do gênero
9 *Neospora*, uma vez que não reagiram com soro positivo para *T. gondii*;
- 10 • Ambas as proteínas demonstraram antigenicidade, sendo consideradas boas
11 ferramentas a serem utilizadas no diagnóstico da neosporose bovina e ovina;
- 12 • O ELISA indireto utilizando as proteínas, rNcSRS2 e rNcSAG1, de forma
13 individual, tanto para bovinos quanto para ovinos, apresentou alta
14 especificidade. No entanto, pode-se observar que a sensibilidade foi
15 prejudicada;
- 16 • O ELISA indireto com as proteínas associadas apresentou resultados
17 superiores ao Elisa com as proteínas isoladas, uma vez que uma alta
18 sensibilidade do teste foi mantida, sem perder especificidade, tanto para
19 bovinos, quanto para ovinos;
- 20 • O ELISA rNsSRS2/rNcSAG1 é uma ferramenta viável, sensível e específica,
21 sendo uma alternativa no diagnóstico da neosporose bovina e ovina.

22

23

24

25

26

27

28

29

30

Referências

- ACOSTA, I. C. L.; CENTODUCATTE, L. D.; SOARES, H. S.; MARCILI, A.; GONDIM, M. F. N.; JUNIOR, J. L. R.; GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from rural properties surrounding a biological reserve, Espírito Santo, Brazil. . **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 536-539, 2016.
- ANDRADE, G. S.; BRUHN, F. R.; ROCHA, C. M.; DE SA, G. A.; GOUVEIA, A. M.; GUIMARAES, A. M. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 584-586, 2013.
- ANDREOTTI, R.; MATOS, M. F.; GONCALVES, K. N.; OSHIRO, L. M.; LIMA-JUNIOR, M. S.; PAIVA, F.; LEITE, F. L. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 19-22, 2009.
- ASMARE, K.; REGASSA, F.; ROBERTSON, L. J.; SKJERVE, E. Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 85-94, 2013.
- AZEVEDO, S.S.; PENA, H.F.; ALVES, C.J.; GUIMARAES FILHO, A.A.; OLIVEIRA, R.M.; MAKSIMOV, P.; SCHARES, G.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.2, p.80-84, 2010.
- BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P.; PINTO, L. S.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F.; BERNE, M. E. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 33-38, 2011.
- BYREM, T. M.; BARTLETT, P. C.; DONOHUE, H.; VOISINET, B. D.; HOUSEMAN, J. T. Performance of a commercial serum ELISA for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in whole and skim milk samples. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1-2, p. 249-253, 2012.
- CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, N. T.; OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M.; FAVA, C. D. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology,

immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.

CARDOSO, J. M.; AMAKU, M.; ARAUJO, A. J.; GENNARI, S. M. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 553-557, 2012.

COBADIOVA, A.; VICOVA, B.; MAJLATHOVA, V.; REITEROVA, K. First molecular detection of *Neospora caninum* in European brown bear (*Ursus arctos*). **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 346-349, 2013.

CONSTANTINO, C. ; PELLIZZARO, M.; DE PAULA,E. F. E.; VIEIRA, T. S. W. J.; BRANDÃO, A. P. D.; FERREIRA, F.; VIEIRA, R. F. C.; LANGONI, H.; BIONDO,A. W. Serosurvey for *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Neospora caninum* in neighborhood dogs in Curitiba-Paraná, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 504-510, 2016.

DE SA, G. L.; DE BORBA, P. D.; MONTE, L. G.; SINNOTT, F. A.; XAVIER, M. A.; RIZZI, C.; BORSUK, S.; BERNE, M. E.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C. P. Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*. **Current Microbiology**, 2014.

DE SOUSA, M.E.; PORTO, W.J.; DE ALBUQUERQUE, P.P.; DE SOUZA NETO, O.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in the state of Alagoas, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.3, p.287-290, 2012.

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

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

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

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental

transmission. **American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.

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

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

FARIA, E.B.; CAVALCANTI, E.F.; MEDEIROS, E.S.; PINHEIRO, J.W., Jr.; AZEVEDO, S.S.; ATHAYDE, A.C.; MOTA, R.A. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in sheep from the State of Alagoas, in the northeast region of Brazil. **Journal Parasitology**, v.96, n.1, p.197-199, 2010.

FEITOSA, T.F., VILELA, V.L.R., BEZERRA DE MELO, L.R., DE ALMEIDA NETO, J.L., DE OLIVEIRA SOUTO, D.V., DE MORAIS, D.F., ATHAYDE, A.C.R., AZEVEDO, S.S., DE JESUS PENA, H.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 305–309, 2014.

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

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

GHALMI, F.; CHINA, B.; JENKINS, M.; AZZAG, N.; LOSSON, B. Comparison of different serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and canine sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2014.

GOFF, W. L.; MCELWAIN, T. F.; SUAREZ, C. E.; JOHNSON, W. C.; BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Rhopty-Associated Protein 1 Epitope Specifically Identifies *Babesia bovis*-Infected Cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 1, p. 38-43, 2003.

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

GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K.; UZEDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.; GONDIM, L.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.168, n.1-2, p.121-124, 2010.

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

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

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

HE, P.; LI, J.; GONG, P.; LIU, C.; ZHANG, G.; YANG, J.; TUO, W.; YANG, B.; ZHANG, X. *Neospora caninum* surface antigen (p40) is a potential diagnostic marker for cattle neosporosis. **Parasitology Research.**, v. 112, p. 2117-2120.

HOWE, D. K.; CRAWFORD, A. C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L. D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity.**, v.66, n.11, p.5322-5328, 1998.

HOWE, L.; COLLETT, M.G.; PATTISON, R.S.; MARSHALL, J.; WEST, D.M.; POMROY, W.E. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v.185, n.2-4, p.64-71, 2012.

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

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

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

JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G.; AGUADO-MARTINEZ, A.; SALMAN, H.; IRACHE, J. M.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-epsilon-caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 33, p. 4983-4992, 2012.

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

LANGONI, H., FORNAZARI, F., DA SILVA, R.C., MONTI, E.T., VILLA, F.B. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 44, p. 1327–30, 2013.

LANGONI, H., GRECA, H., GUIMARÃEES, F.F., ULLMANN, L.S., GAIO, F.C., UEHARA, R.S., ROSA, E.P., AMORIM, R.M., DA SILVA, R.C. Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 50–54. 2011.

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

MAGALHÃES, V.C.S. DE, OLIVEIRA, U.V. DE, COSTA, S.C.L., SANTOS, I. DOS A., PEREIRA, M.J.S., MUNHOZ, A.D. Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 257–264. 2014.

MARUGAN-HERNANDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; AGUADO-MARTINEZ, A.; JIMENEZ-RUIZ, E.; ALVAREZ-GARCIA, G. Transgenic *Neospora caninum* strains

constitutively expressing the bradyzoite NcSAG4 protein proved to be safe and conferred significant levels of protection against vertical transmission when used as live vaccines in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 44, p. 7867-7874, 2011.

MINERVINO, A.H.; CASSINELLI, A.B.; DE LIMA, J.T.; SOARES, H.S.; MALHEIROS, A.F.; MARCILI, A.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti- *Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from two different indigenous communities in the Brazilian Amazon Region. **Journal Parasitology**, v. 98, n. 6, p.1276-1278, 2012.

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

OSHIRO, L. M.; MOTTA-CASTRO, A. R. C.; FREITAS, S. Z.; CUNHA, R. C.; DITTRICH, R. L.; MEIRELLES, A. C. F.; ANDREOTTI, R. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 568-672, 2015.

PAIZ, L.M., DA SILVA, R.C., MENOZZI, B.D., LANGONI, H. Antibodies to *Neospora caninum* in sheep from slaughterhouses in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 95–100, 2015.

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

PIAGENTINI, M., MOYA-ARAUJO, C.F., PRESTES, N.C., SARTOR, I.F. *Neospora caninum* infection dynamics in dairy cattle. **Parasitology Research**, v. 111, p. 717–721, 2012.

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

PINHEIRO, A. F., ROLOFF, B.C., DA SILVEIRA MOREIRA, A., BERNE, M.E.A., SILVA, R.A., LEITE, F.P.L. Identification of suitable adjuvant for vaccine formulation with the *Neospora caninum* antigen NcSRS2. **Vaccine**, v. 36, p. 1154-1159, 2018.

PLUGGE, N.F., FERREIRA, F.M., RICHARTZ, R.R.T.D.B., SIQUEIRA, A. DE, DITTRICH, R.L. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 202–206, 2011.

RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; MORAES, L. M. B.; SANTOS, L. Z.; NEPOMUCENO, L. L.; BARBOSA, S. M.; PIRES, M. S.; SANTOS, H. Z.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Tocantins: serology and associated factors. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 475-481, 2015.

ROSSI, G.F., CABRAL, D.D., RIBEIRO, D.P., PAJUABA, A.C.A.M., CORRÊA, R.R., MOREIRA, R.Q., MINEO, T.W.P., MINEO, J.R., SILVA, D.A.O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 252–259, 2011.

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

SINNOTT, F.A.; MONTE, L.G.; COLLARES, T.F.; DE MATOS, B.M.; PACHECO, D.B.; BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C.P. Blocking elisa using recombinant NcSRS2 protein for diagnosing bovine neosporosis. **Current Microbiology**, v. 70, p. 429–432, 2014.

SINNOTT, F. A., MONTE, L. G., COLLARES, T. F., SILVEIRA, R. M., BORSUK, S. Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011-2016). **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 10-25, 2017.

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

TEMBUE, A.A.S.M., RAMOS, R.A.D.N., SOUSA, T.R. DE, ALBUQUERQUE, A.R., COSTA, A.J. DA, MEUNIER, I.M.J., FAUSTINO, M.A.D.G., ALVES, L.C. Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 246–248, 2011.

TOPAZIO, J.P., WEBER, A., CAMILLO, G., VOGEL, F.F., MACHADO, G., RIBEIRO, A., MOURA, A.B., LOPES, L.S., TONIN, A.A., SOLDÁ, N.M., BRÄUNIG, P., SILVA, A.S., Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 23, p. 360-366, 2014.

VALADAS, S.; GENNARI, S.M.; YAI, L.E.; ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in Capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from Sao Paulo State, **Brazilian Journal Parasitology**, v.96, n.3, p.521-524, 2010a.

VALADAS, S.; MINERVINO, A.H.; LIMA, V.M.; SOARES, R.M.; ORTOLANI, E.L.; GENNARI, S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Para State, Amazon, Brazil. **Parasitology Research**, v.107, n.2, p.453-457, 2010b.

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

WILKOWSKY, S.E.; BAREIRO, G.G.; MON, M.L.; MOORE, D.P.; CASPE, G.; CAMPERO, C.M.; FORT, M.; ROMANO, M.I. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 971–976, 2011.