

Trabalho de Conclusão de Curso – 2016/01



Aluno: Camilo de Oliveira Lirio

Cartão: 00218349

Orientadora: Neusa Saltiel Stobbe

Curso: Bacharelado em Ciências Biológicas

Modelo: Artigo científico

Conforme regras do periódico: Revista de Patologia Tropical (versão em português)

Porto Alegre, junho de 2016.

Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em pacientes soropositivos para HIV e doadores de sangue

Camilo de Oliveira Lirio¹, Edelvan Nunes², João Henrique Corrêa Kanan³, Neusa Saltiel Stobbe³

E-mail camilolirio@hotmail.com

1 Graduando do curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2 Bacharel de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3 Setor de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Resumo

Neospora caninum é um protozoário que causa doenças reprodutivas e neurológicas em animais. A doença em humanos não foi comprovada, mas a presença de anticorpos foi constatada em pessoas saudáveis e em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os objetivos deste trabalho foram verificar a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* e relacioná-la com a condição de soropositividade para o HIV. Para isso foram constituídos dois grupos: um com amostras de soro sanguíneo de 310 pessoas soropositivas para HIV e outro com amostras de 261 doadores de sangue. Todas as amostras foram testadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) diluídas a 1:25, para verificar a presença de imunoglobulinas G contra *N. caninum*. Os resultados foram: 29,7% (92/310) das amostras de soros de pessoas HIV positivas e 11,1 % (29/261) das amostras de doadores de sangue foram reagentes para a presença dos anticorpos. A análise de risco relativo indicou que o grupo HIV positivo teve 3,376 mais chances de ser soro reagente para *N. caninum* do que o grupo de doadores de sangue e o qui-quadrado foi significativo ($\chi^2=29,248$; $p < 0,001$). A exposição ou infecção de humanos com *N. caninum* é evidente na população estudada. A alta significância dos resultados comprova a correlação positiva entre

as condições de soropositividade para HIV e *N. caninum*, tornando necessária a investigação do caráter oportunista deste protozoário em pacientes imunocomprometidos.

Palavras-chave: neosporose, AIDS, imunologia, protozoologia, imunofluorescência

Introdução e objetivos

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa (Dubey et al., 1988a) de importância veterinária que tem como hospedeiro definitivo os cães e alguns canídeos silvestres (McCallister *et al.*, 1998; Lindsay et al., 1999). Seu ciclo de vida envolve três estágios principais: oocistos, estágio desenvolvido apenas pelo hospedeiro definitivo; taquizoítos e bradizoítos que são estágios encontrados nos hospedeiros intermediários, sendo ambos intracelulares. Os hospedeiros intermediários podem ser bovinos, caprinos, bubalinos, equinos e caninos (McCallister, 1999).

Humanos podem se infectar com o parasito ao comerem carne de hospedeiros intermediários malcozida contendo bradizoítos ou vegetais mal higienizados contendo oocistos liberados por algum hospedeiro definitivo.

Este protozoário possui semelhanças estruturais, genéticas e imunológicas com o *Toxoplasma gondii*, em animais, provoca quadros clínicos neurológicos e reprodutivos que já foram confundidos com toxoplasmose (Dubey & John, 2003). Apesar das semelhanças, as duas espécies têm características antigênicas diferentes e podem ser distinguidas por métodos imunológicos como a imunofluorescência indireta (Barratt et al., 2010).

O potencial zoonótico de *N. caninum* ainda é desconhecido (Dubey and Lindsay, 1996) e não existe registro de neosporose em humanos (Graham et al., 1999). Entretanto, Sundermann & Estridge (1999) demonstraram que taquizoítos de *N. caninum* tem potencial de penetrar fibroblastos epiteliais humanos *in vitro*, sugerindo que humanos podem ser infectados. Além disto, o sucesso da transmissão experimental do agente para primatas não humanos (Barr et al., 1994) e posterior detecção de taquizoítos do parasito nos tecidos destes

primatas (Ho et al., 1997) demonstra ainda mais a necessidade de se investigar a infecção em humanos.

Aparentemente o parasito também não causa aborto em humanos (Petersen et al., 1999). Graham et al. (1999) testaram amostras de soros de doadores de sangue e de trabalhadores agrícolas pela RIFI ao título 1:160 e constataram frequências de 5,5% e 4,2% de sororeagentes para o parasito, respectivamente. O maior estudo com doadores de sangue foi realizado por Tranas et al., (1999) em que 1029 amostras de soros foram testadas, destas 6,7% foram reagentes. Em estudo com pacientes soropositivos para HIV utilizando RIFI ao título 1:50, 26,1% foram soro reagentes no Mato Grosso do Sul e 31,2% no Paraná (Oshiro et al., 2015). Em Minas Gerais, Lobato et al. (2006) encontraram soroprevalência de anticorpos para *N. caninum* de 38% em pacientes HIV positivos e de 18% em pacientes com desordens neurológicas em soros diluídos a 1:25.

Este trabalho teve como objetivos verificar a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum* e relacioná-la com a condição de soropositividade para o vírus da imunodeficiência (HIV) em humanos.

Material e métodos

Amostras

Toda a metodologia foi executada em conformidade com a Declaração de Helsinque de 1964, revisada em 2013 (WMA, 2013), teve aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 2004266). O termo de consentimento livre e esclarecido não foi utilizado pelo fato das amostras não conterem a identificação dos pacientes e doadores no momento da sua obtenção nos laboratórios.

Um tamanho amostral mínimo de 400 amostras foi estimado pressupondo-se prevalência de 6% de anticorpos contra *N. caninum* em população humana sadia, ao nível de

significância de 5% (Zar, 1999). Neste estudo foram obtidas 571 amostras de soro sanguíneo humano do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sendo 310 amostras de pessoas sororeagentes para HIV e 261 amostras de doadores de sangue. Os testes laboratoriais para verificar a condição de positividade para os vírus HIV-1 e HIV-2, Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus T-Linfotrófico Humano (HTLV) e Sífilis foram previamente realizados na Unidade de Bioquímica e Imunoensaio do Serviço de Patologia Clínica do Banco de Sangue, utilizando a técnica de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) seguindo os padrões da legislação vigente.

Todas as amostras foram armazenadas congeladas a -20°C até a realização dos testes imunológicos no laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

Métodos

Todas as amostras foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum*, segundo Dubey et al. (1988b), utilizando, como anticorpo secundário, globulina de carneiro anti-imunoglobulina humana G marcada com fluoresceína (Fluoline G[®], Biolab Mérieux S/A). As amostras foram testadas frente ao antígeno de *N. caninum*, cepa NC-1 na forma de taquizoítos (Kit Imunoteste[®] *Neospora* (RIFI): Imunodot Diagnósticos Ltda).

As amostras foram diluídas a 1:25 (Schaes et al., 1999; Venturini et al, 1999; Martins et al., 2011) em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,2 com soro-albumina bovina a 1%. Amostras de soro sanguíneo humano previamente triadas como positivas e negativas para a presença de anticorpos contra *N. caninum* em experimento anterior foram utilizadas como controles.

As incubações dos soros com antígeno e com anticorpo secundário foram feitas em câmara úmida por 40 minutos em estufa a 30°C. Após as incubações as lâminas passaram por duas lavagens de 5 minutos cada, com PBS e agitação suave. O contra corante utilizado foi o azul de Evans diluído a 1:100 com o anticorpo secundário. A montagem das lâminas para

leitura foi feita aplicando-se duas gotas de glicerina tamponada e com posterior sobreposição de lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência, em 400x, com filtro de luz ultravioleta e lâmpada de mercúrio.

Uma reação foi considerada positiva (figura 1) quando a fluorescência se apresentou amarelo-esverdeada contornando plenamente os taquizoítos (Paré et al., 1995). Reações com fluorescência ausente ou apenas fluorescência apical foram consideradas negativas.

Análise estatística

Os resultados dos testes sorológicos foram submetidos a teste estatístico de qui-quadrado para um nível de significância mínimo de 0,05 no programa de análises estatísticas SPSS versão 18 com o auxílio da equipe de estatística do Núcleo de Assistência Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS). Os dados também foram submetidos à análise de risco relativo (Odds ratio) ao nível de confiança de 95%.

Resultados

Os testes imunológicos pela técnica de imunofluorescência indireta revelaram que 29,7% (92/310) das amostras de soros de pessoas HIV positivas e 11,1 % (29/261) das amostras de doadores de sangue foram positivas para presença de anticorpos contra *Neospora caninum* ao título de 1:25.

A análise estatística pelo teste qui-quadrado de Pearson mostrou diferença estatisticamente significativa entre as frequências de anticorpos contra *N. caninum* comparando-se os dois grupos ($\chi^2=29,248$; $p < 0,001$). A análise de risco relativo indicou 3,376 mais chances de infecção pelo parasito em pacientes HIV positivos em relação ao grupo de doadores.

Discussão e conclusões

Neste estudo e em todos os aqui citados utilizou-se RIFI como técnica de análise por ser o teste referência para detecção de anticorpos contra *N. caninum*, tendo em vista a alta especificidade e baixa chance de reação cruzada com outros protozoários do Filo Apicomplexa como o *T. gondii* (Björkman & Uggl, 1999).

A diferença na titulação de cada estudo se deve ao fato de ainda não existir um consenso sobre o ponto de corte para a espécie humana. A diluição de 1:25 foi escolhida tendo em vista a pouca literatura sobre a soroprevalência de *Neospora caninum* em humanos e, portanto, poucos parâmetros para estabelecer diluições maiores como ponto de corte. Além disto, este é o ponto de corte utilizado em estudos com animais silvestres quando não há informações de prevalência anteriores (Dubey et al., 2009). Ainda, em animais com ponto de corte bem definidos, como cães domésticos e bovinos, quando o objetivo do estudo é epidemiológico, parte-se desta diluição inicial dos soros (More et al., 2009).

T. gondii e *N. caninum* especiaram de um ancestral comum há aproximadamente 28 milhões de anos (Reid et al., 2012); enquanto a toxoplasmose é importante em imunocomprometidos, a neosporose parece não se manifestar. Em estudo sobre competição Sundermann & Estridge (1999) constataram que *T. gondii* suprime o crescimento de *N. caninum* quando inoculados juntos em fibroblastos epiteliais humanos *in vitro*. No entanto, *in vivo* é possível a ocorrência concomitante destes agentes.

No presente estudo verificou-se maior prevalência de anticorpos contra *N. caninum* em pacientes HIV positivos, concordando com os resultados de Lobato et al. (2006) e Oshiro et al. (2015), o que reforça a hipótese de que este parasito possa ser oportunista. Neste sentido, é importante salientar que este protozoário é capaz de proliferar em células endoteliais microvasculares da barreira hemato-encefálica do cérebro humano *in vitro* (Elsheikha et al., 2013), o que pode estar relacionado ao resultado de Lobato et al. (2006), que encontraram soropositividade maior em pacientes com problemas neurológicos do que em pessoas saudáveis.

Estudos prévios comprovaram que pessoas saudáveis apresentam baixa prevalência de anticorpos contra o parasito, pois observou-se frequências semelhantes em trabalhadores agrícolas (4,2%), que estariam mais expostos ao parasito e em doadores de sangue de áreas urbanas (5,5%) (Graham et al. 1999). Outro estudo com doadores de sangue de uma região onde a neosporose é a principal doença reprodutiva de bovinos, obteve prevalência baixa também, de 6,7% (Tranas et al., 1999). Os dados destes estudos corroboram com os aqui encontrados em que 11% (29/261) das amostras de soros de doadores de sangue mostraram-se positivas. A percentagem de soro reagentes neste grupo pode ter sido um pouco maior no presente estudo tendo-se em vista a diluição utilizada (1:25) em relação à diluição dos outros estudos (1:160 e 1:50, respectivamente), além disto, os costumes da população na região onde os soros foram avaliados (Rio Grande do Sul) de comer carne malcozida com frequência podem ter influenciado na sorologia mais elevada.

Dito isto, constata-se que parece não haver diferença na prevalência de anticorpos contra o parasito entre populações saudáveis que estariam menos expostas, se compararmos com populações saudáveis mais expostas ao *N. caninum*. Entretanto na presença do HIV ocorre um nítido aumento na soroprevalencia destes anticorpos, embora não se tenha encontrado relação direta entre a carga viral de pacientes HIV positivos e a soro prevalência para o parasito (Lobato et al., 2006).

Provavelmente essa maior prevalência se deve à imunodepressão causada pelo HIV em que o sistema imunológico dos pacientes tem dificuldade em controlar a infecção pelo parasito através de suas barreiras imunológicas inatas e então há uma maior produção de anticorpos específicos. Como *N. caninum* é um parasito intracelular, portanto a resposta mediada por células do sistema imune é importante (Hemphill et al., 1999). Pessoas com HIV podem ter maior dificuldade em mediar a resposta celular, enquanto a maioria dos pacientes do grupo de doadores quando entram em contato com *N. caninum* parecem conseguir controla-lo sem a necessidade de ativar uma grande produção de anticorpos específicos contra o parasito, tendo em vista para isso que as diferenças na exposição parecem não afetar a soroprevalência dos anticorpos.

O trato gastrointestinal é um dos principais órgãos afetados por infecções secundárias e doenças malignas em pacientes soropositivos para o HIV. Isso se deve provavelmente a uma queda no número de células T CD4+ na circulação periférica de pessoas HIV positivos em comparação com soronegativos para o vírus (Zeitz et al, 1998). Isso sugere que há um descontrole nos mecanismos de defesa deste local causado pelo vírus. Veazey et al., (1998) observa que há queda no número de células T CD4+ na mucosa intestinal de macacos transcorridas duas semanas da infecção pelo vírus símio da imunodeficiência (SIV), equivalente ao HIV em humanos.

Visto que a infecção por *N. caninum* se dá principalmente por via oral, é através do trato gastrointestinal que o parasito invade células do epitélio da mucosa, fibroblastos e leucócitos, transformando-se em taquizoítos que podem se disseminar pelos demais tecidos do corpo (Dubey, 1998a), não existem estudos que indiquem os órgãos alvos do parasito em humanos, porém observando-se a infecção em outros animais sugere-se que os músculos seriam os mais afetados.

O um maior descontrole nas defesas imunológicas da mucosa intestinal parece ser importante para explicar a maior prevalência de anticorpos para o parasito em pacientes soropositivos para o HIV, não existe comprovação de que a mucosa intestinal esteja mais suscetível a lesões nestes pacientes, neste sentido estudos poderiam ser importantes para explicar a diferença na prevalência dos anticorpos contra o parasito nos grupos amostrais estudados.

Este trabalho, portanto, demonstra a importância da imunodeficiência atrelada ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) na infecção por *Neospora caninum* e sugere que o parasito possa se comportar de maneira oportunista, principalmente como infecção secundária observada em pacientes imunocomprometidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem às equipes do Banco de Sangue e da Unidade de Bioquímica e Imunoensaio do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por

terem cedido as amostras de soro analisadas no estudo e ao Núcleo de Assistência Estatística (NAE) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela presteza e apoio nas análises estatísticas.

Referências

Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation* 71: 236-242, 1994.

Barratt JLN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. Importance of Nonenteric Protozoan Infections in Immunocompromised People. *Clinical Microbiology Reviews* 23(4): 795-836, 2010.

Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 29(10): 1497-1507, 1999.

Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1269-1285, 1988a.

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193: 1259-1263, 1988b.

Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* 67: 1-59, 1996.

Dubey JP, John P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology* 41(2): 138, 2003.

Dubey JP, Jenkins MC, Kwok OCH, Zink RL, Michalski ML, Ulrich V, Gill J, Carstensen M, Thulliez P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests. *Vet. Parasitol.* 161: 330-334, 2009.

- Elsheikha HM, McKinlay CL, Elsaied NA, Smith PA. Effects of *Neospora caninum* infection on brain microvascular endothelial cells bioenergetics. *Parasit Vectors* 25: 6-24, 2013.
- Graham DA, Calvert V, Whyte M, Marks J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Veterinary Record* 144: 672-673, 1999.
- Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 29: 1175-1188, 1999.
- Ho MS, Barr BC, Tarantal AF, Lai LT, Hendrickx AG, Marsh AE, Sverlow KW, Packham AE, Conrad PA. Detection of *Neospora* from Tissues of Experimentally Infected Rhesus Macaques by PCR and Specific DNA Probe Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 35(7): 1740-1745, 1997.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82: 327-333, 1999.
- Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral DJ, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 84-89, 2006.
- Martins J, Kwok OC, Dubey JP. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Vet Parasitol.* 182(2-4): 349-351, 2011.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Intern. J. Parasitol.* 28: 1473-1478, 1998.
- McAllister M.M. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today* 15: 216-217, 1999.
- More G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet. Parasitol.* 160: 51-54, 2009.

Oshiro LM, Freitas AC, Cunha SZ, Dittrich RC, Meirelles RL, Ferreira AC, Andreotti R. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(5): 568-572, 2015.

Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Björkman C, Uggla A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerging Infectious Diseases* 5(2): 278-280, 1999.

Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Könen-Waisman S, Latham SM, Mourier T, Norton R, Quail MA, Sanders M, Shanmugam D, Sohal A, Wasmuth JD, Brunk B, Grigg ME, Howard JC, Parkinson J, Roos DS, Trees AJ, Berriman M, Pain A, Wastling JM. Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia Differing in Host Range and Transmission Strategy. *PLoS Pathog* 8(3): e1002567, 2012.

Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7(2): 273-275, 1995.

Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurn R, Dubey JP, Degraaf DC, Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ. Serological differences in *Neospora*-associated epidemic and endemic abortions. *J. Parasitol.* 85(4): 688-694, 1999.

Sundermann CA, Estridge BH. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *International Journal for Parasitology* 29: 1725-1732, 1999.

Tranas J, Heinzen RA, Weiss LM, McAllister MM. Serological Evidence of Human Infection with the Protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(5): 765-767, 1999.

Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA. Gastrointestinal tract as a major site of CD4₊ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280: 427-431, 1998.

Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, Unzaga JM, Dilorenzo C, Guglielmone A, Jenkins MC, Dubey JP. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29: 1705-1708, 1999.

World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 310(20): 2191-2194, 2013.

Zar, J. H. *Biostatistical analysis*. 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall: 930, 1999.

Zeitz, M, Ullrich R, Schneider T, Kewenig S, Riecken E. Mucosal immunodeficiency in HIV/SIV infection. *Pathobiology* 66: 151-157, 1998.

Figuras e tabelas

Figura 1 – Imagem de uma reação positiva para presença de anticorpos contra *Neospora caninum* pela técnica de imunofluorescência indireta, onde se observam taquizoítos com fluorescência periférica completa – aumento 400 vezes, em microscópio de epifluorescência. Acervo pessoal de Neusa Saltiél Stobbe.

