

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Ncp43 NO DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

**PEREIRA, Wallace Moraes<sup>1</sup>; SÁ, Gizele Lima<sup>1</sup>; LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos<sup>1</sup>; BERNE, Maria Elisabeth Aires<sup>2</sup>; HARTLEBEN, Cláudia Pinho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunodiagnóstico, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas; <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

[wallpereira@gmail.com](mailto:wallpereira@gmail.com)/[claudia.hartleben@pq.cnpq.br](mailto:claudia.hartleben@pq.cnpq.br)

### 1 INTRODUÇÃO

A Neosporose, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, possui grande importância veterinária por causar aborto, natimortos, nascimentos prematuros e infecções em bovinos, seu hospedeiro intermediário, e doenças neuromusculares em caninos, seu hospedeiro definitivo, além de causar infecções em outras espécies ruminantes, como cabras, ovelhas e veados (ANDREOTTI *et al.*, 2003; DUBEY *et al.*, 2006). Desde a descoberta do *N. caninum* em 1999, onde até então era diagnosticado erroneamente como *Toxoplasma gondii* devido à similaridade em lesões em exames histopatológicos, este agente vem sendo citado como um dos principais causadores de abortos à bovinocultura mundial (DUBEY *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2000), destacando assim sua importância econômica na pecuária.

A técnica de imunofluorescência, considerada como padrão ouro no diagnóstico da Neosporose, utiliza taquizoítos intactos como antígenos visando à ligação de anticorpos a proteínas de superfície celular do parasito (DUBEY *et al.*, 2006; BJORKMAN & UGGLA, 1999). Porém a técnica é laboriosa, devido a manutenção do cultivo do *N. caninum in vitro*, possui resultado subjetivo, devido a reações cruzadas com outros parasitas coccídeos, como o já citado *Toxoplasma gondii* (DUBEY *et al.*, 2003), além de não permitir uma reprodutibilidade em larga-escala. Em contraste, a técnica de Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) utilizando antígenos imunodominantes específicos de *N. caninum* permite uma alta reprodutibilidade, eficiência na quantificação dos dados e dispensa o laborioso cultivo celular.

A caracterização de antígenos específicos do filo apicomplexa, o qual inclui o gênero *Neospora*, proporciona baixa percentagem de reação cruzada com outros parasitas do mesmo filo (BJORKMAN & UGGLA, 1999). Entre suas proteínas de membrana imunodominantes, a Ncp43 destaca-se por estar presente tanto no estágio de taquizoíto quanto no estágio de bradizoíto (NISHIKAWA *et al.*, 2001) e foi reportada como uma ferramenta em potencial na detecção de anticorpos presentes em soros bovinos, reforçando o uso desta proteína em ensaios imunoenzimáticos (BORSUK *et al.*, 2010).

Devido ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial imunogênico da proteína imunodominante Ncp43 produzida em *E. coli* na identificação de anticorpos presentes em soros de bovino, ovinos e caninos naturalmente infectados.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 Expressão da proteína recombinante Ncp43 (rNcp43) em *E. coli*

O gene o qual codifica a proteína Ncp43 foi clonado no vetor pET100/D-TOPO e utilizado para transformar a cepa de *E. coli* BL21 Star por choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram cultivadas em 500 µL de meio Luria Bertani (LB) contendo ampicilina por 1 h a 37 °C, plaqueadas em meio LB sólido e incubadas *overnight* a 37 °C. As colônias transformadas foram incubadas por 24 h a 37 °C em 10 mL de LB e este transferido para 500 mL de LB líquido contendo ampicilina, novamente incubadas a 37 °C até a atingirem sua fase estacionária de crescimento com densidade óptica entre 0.6 e 0.8. A expressão da proteína foi induzida com isopropil -D-thiogalactoside 0.75-mM (IPTG) e o pellet resultante foi lisado em três ciclos de sonicação (15 s, 20 kHz), lavado e ressuspenso em 30 mL de *Acta Wash* com 0,2 % de Lauroyl Sarcosine, 30 µL de PMSF a 100 mM e 15 µL de Triton X-100; e mantido sob fraca agitação por 72 h a 4 °C. Decorrido este período, as células foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 60 min a 4 °C e o sobrenadante contendo a proteína foi submetido a filtração em filtro 0,8 µm (Millipore). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna *Hip Trap* (GE Healthcare) carregada com íons de Ni<sup>2+</sup>, a concentração foi determinada utilizando Kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) e a expressão da proteína rNcp43 foi confirmada em gel de SDS-PAGE e *Western blotting* usando anticorpos anti-x6His produzidos em camundongo.

## 2.2 Soros

Os soros usados neste experimento foram cedidos pela professora Dr<sup>a</sup> Nara Farias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, a partir de rebanhos utilizados em levantamentos epidemiológicos de neosporose. Trinta soros bovinos, trinta soros ovinos e vinte soros caninos foram usados, sendo metade destes positivos para *N. caninum*. Antes dos ensaios as amostras foram previamente testadas por imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com PITEL *et al.*(2001).

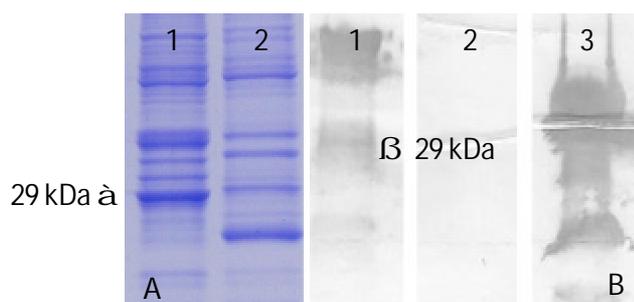
## 2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) indireto

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 50 ng/poço de rNcp43 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 *overnight* a 4 °C, lavadas com PBS Tween 20 0,05 % (PBS-T) e bloqueadas com 5 % de leite em pó desnatado. Os soros controles negativo e positivo e os soros de animais naturalmente infectados das espécies bovina, ovina e canina, diluídos 1:100 em PBS-T foram adicionados e mantidos por 1 h a 37 °C. Após, 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase (Sigma Chemicals, USA) bovino (diluído 1:4000), ovino (diluída 1:2000) e canino (diluída 1:5000) seguido de incubação a 37 °C por 1 h. As reações foram reveladas com o substrato o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) acrescido de peróxido de hidrogênio, por 15 min no escuro. A leitura da densidade óptica foi feita em filtro de 450 nm em leitor de ELISA (VICTOR<sup>TM</sup>X5/2030 Multilabel Reader - PerkinElmer). A solução de PBS-T foi utilizada em todas as lavagens de placa. A análise estatística foi realizada através do cálculo de média, desvio padrão e ponto de corte, no qual foi utilizada a média de absorbância dos soros negativos de cada espécie acrescida de duas vezes seu desvio padrão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi descrita a clonagem e a expressão da proteína rNcp43 de *N. caninum* em *E. coli*. A análise por SDS-PAGE 12 % revelou uma banda

característica e de tamanho esperado, sugerindo a expressão da proteína recombinante (Figura 1A). Um ensaio de *Western blot* foi realizado para confirmar a expressão específica da rNcp43 (Figura 1B).



**Figura 1.** Avaliação da expressão da proteína rNcp43 em *E.coli*. **Painel A:** SDS-PAGE das alíquotas contendo a proteína rNcp43. 1- *E. coli* BL21 Star expressando a proteína rNcp43, 2- extrato de *E. coli* BL21Star. **Painel B:** *Western blotting* para detecção da proteína rNcp43 expressa em *E. coli* BL21 Star. 1- rNcp43 (~29kDa) de *N. caninum*, 2- Controle negativo (extrato de *E. coli* BL21Star), 3- Controle positivo rAg85B (32.4 kDa) de *Mycobacterium bovis*.

Após a caracterização da rNcp43, a reatividade dessa proteína foi avaliada através de ELISA indireto utilizando um painel de soros de animais positivos e negativos para a neosporose. Como pode ser observado, a rNcp43 foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de animais naturalmente infectados (Tabela 1). Todos os soros positivos bovinos, ovinos e caninos reagiram no ELISA/rNcp43 e obtiveram média de absorvância superior ao ponto de corte inferido, demonstrando a imunogenicidade da proteína recombinante no diagnóstico da Neosporose nestas três espécies.

**Tabela 1.** Avaliação da imunogenicidade da proteína rNcp43 através de ELISA indireto.

| Soros*          | Média (ABS) | Desvio padrão ( $\pm$ ) | Ponto de corte |
|-----------------|-------------|-------------------------|----------------|
| Bovino positivo | 1,263       | 0,384                   | 0.756          |
| Bovino negativo | 0,599       | 0,186                   |                |
| Ovino positivo  | 0,624       | 0,109                   | 0.384          |
| Ovino negativo  | 0,296       | 0,044                   |                |
| Canino positivo | 0,322       | 0,049                   | 0,234          |
| Canino negativo | 0,164       | 0,035                   |                |

\*Soros previamente testados por imunofluorescência indireta.

Os resultados obtidos para as espécies bovina e ovina estão de acordo com estudos realizados por BORSUK *et al.* (2010) e ANDREOTTI *et al.* (2009), respectivamente.

Além disso, o recentemente desenvolvido ELISA-Sanduiche comercial utilizando anticorpos monoclonais contra a proteína nativa Ncp43 foi validado para diagnóstico de neosporose bovina e canina (GHALMI *et al.*, 2009) e os resultados obtidos neste experimento reforçam a utilização da proteína recombinante Ncp43 em ensaios imunoenzimáticos para neosporose canina.

#### 4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a estratégia de expressão da proteína em rNcp43 em *E.coli* foi eficiente, uma vez que

possibilitou a clonagem e a produção do alvo de *N. caninum* selecionado. Além disso, os resultados do ELISA indireto proposto corroboraram com a técnica de diagnóstico padrão. A proteína rNcp43 aqui produzida possui potencial para a elaboração de ensaios que visem a detecção de *N. caninum* em soros de bovinos, ovinos e caninos.

## 5 REFERÊNCIAS

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

ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; PAIVA, F. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. EMBRAPA, 2003.

ANDREOTTI, R.; MATOS, M. F.; GONÇALVES, 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, p.19-22, 2009.

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

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. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 177, p.33-38, 2011.

DUBEY, J.P.; SCHARES G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 140, p.1-34. 2006.

GHALMI, F.; CHINA, B.; KAIDI, R.; LOSSON, B. Evaluation of a SRS2 sandwich commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine and canine sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p.108-111, 2009.

NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; TRAGOLPUA, K.; XUAN, X.; MAKALA, L.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; NAGASAWA, H. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.3987-3991, 2001.

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