

PRODUÇÃO DE CONJUGADO ESPECÍFICO PARA DETECÇÃO DE *Neospora caninum* POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

SÁ, Gizele Lima¹; LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos¹; PACHECO, Diene de Borba¹; BORSUK, Sibeles²; BERNE, Maria Elisabeth Aires³; HARTLEBEN, Cláudia Pinho¹

¹Laboratório de Imunodiagnóstico; ² Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas; ³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
gezelha@hotmail.com/clauhart@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* é um protozoário heteróxico intimamente relacionado com o *Toxoplasma gondii*, causador de distúrbios neuromusculares no hospedeiro definitivo (*Canis familiaris*) e frequentemente diagnosticado como causa de abortos epidêmicos e endêmicos na bovinocultura mundial, uma vez que os bovinos são os principais hospedeiros intermediários deste patógeno (DUBEY et al., 1996). O diagnóstico da neosporose é usualmente baseado em análise histopatológica e imunohistoquímica (IHC). No entanto, em levantamentos epidemiológicos os ensaios que detectam anticorpos específicos contra *N. caninum* são os mais utilizados, uma vez que a presença de anticorpos séricos no animal indica a presença ou a recente infecção com o parasita (DUBEY; SCHARES, 2006), o que possibilita a identificação de rebanhos infectados por *Neospora*.

Entre os ensaios sorológicos a técnica amplamente difundida é a imunofluorescência indireta (IFI) (DUBEY et al., 1988), uma vez que os ensaios imunoenzimáticos, tal como Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA), utilizam antígenos totais do parasita o que os torna menos específicos que a IFI. Os antígenos de membrana detectados pela IFI das espécies do filo apicomplexa, o qual inclui o gênero *Neospora*, são considerados mais específicos do que os antígenos de componentes intracelulares (PACKHAM et al., 1998).

Entre as proteínas de membrana imunodominantes, a Ncp43 destaca-se por estar presente tanto no estágio de taquizoítos como de bradizoítos (NISHIKAWA et al., 2001), sendo considerada como uma ferramenta em potencial na detecção de anticorpos em soros bovinos, reforçando o uso desta proteína em ensaios imunoenzimáticos (BORSUK et al., 2011).

Anticorpos policlonais e monoclonais contra *N. caninum* foram desenvolvidos com o objetivo vacinal e diagnóstico (UCHIDA et al., 2004; LATIF; JAKUBEK, 2008). Em trabalho recente, SOHN e colaboradores (2001) registraram um painel de anticorpos monoclonais (mAbs) contra *N. caninum*, e os mAbs gerados reconheceram uma variedade de proteínas presentes em compartimentos e na superfície do parasito, os quais podem ser usados em vacinas, desenvolvimento de diagnóstico e estudos da imunidade.

Por estes motivos, o objetivo deste trabalho foi produzir um anticorpo policlonal (pAb) monoespecífico contra a proteína rNcp43 conjugado a FITC e avaliar seu potencial na diferenciação de *N. caninum* e *T. gondii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

A proteína rNcp43 foi produzida conforme protocolo estabelecido por BORSUK et al. (2011), purificada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna quelante Hip Trap (GE Healthcare) e a concentração foi determinada utilizando Kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). A expressão da proteína rNcp43 foi confirmada em gel de SDS-PAGE e Western blotting usando anticorpos anti-x6His produzidos em camundongo.

2.2 Anticorpo policlonal (pAb)

O anticorpo policlonal monoespecífico contra a proteína rNcp43 foi produzido de acordo com protocolo estabelecido por CEVENINI et al. (1991). Resumidamente, 100µg de rNcp43 foi emulsificado com um excesso de adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) e inoculado intraperitonealmente nos dias 0, 7, 14 e 21, em dois camundongos BALB/c de 6 semanas tratados com pristane no dia 6. O pAb foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A CL-4B (GE Healthcare Company, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A eficácia da purificação foi avaliada por SDS-PAGE e a concentração final medida por espectrofotometria a 280nm. O pAb foi armazenado a -20°C até sua utilização.

2.3 Produção de conjugado para Imunofluorescência (pAb/rNcp43-FITC)

O conjugado foi preparado segundo WINDSON (2005). Resumidamente, 200µL de tampão carbonato bicarbonato 0,5M pH 9,5 foi adicionado a 1mL de IgG em uma concentração de 25mg/mL, transferido para uma membrana de diálise imersa em frasco contendo 0,9mg de Isotocianato de Fluoresceína Cristalina Isômero (FITC – Sigma Chemicals, EUA) diluído em 1,2mL de tampão carbonato bicarbonato e 4,8mL de solução salina a 0,85% (NaCl) e incubado por 18h a 4°C sob fraca agitação. Após, o conjugado foi dialisado em 3L de NaCl por 3h e purificado em coluna de dessalinização PD-10 contendo Sephadex™ G-25 (GE Healthcare), equilibrada e eluída em PBS 0,01M pH7,5. A viabilidade do conjugado foi avaliada por Imunofluorescência.

2.4 Imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI)

Para a imunofluorescência lâminas contendo taquizoítos de *N. caninum* e *T. gondii* foram utilizadas. Para a IFI, diferentes diluições do pAb em corante azul de Evans, variando de 1:5 a 1:100 foram adicionados as lâminas, incubadas por 45 min a 37°C, lavadas duas vezes com PBS, e adicionadas de anti imunoglobulina G de camundongo (anti-IgG) conjugado com FITC na diluição de 1:100 em tampão PBS, novamente incubadas por 1h em câmara escura úmida por 45min a 37°C. Em cada lâmina foi adicionado soro bovino negativo e positivo para neosporose e respectivo conjugado anti espécie específico. Para experimentos avaliando a reatividade do pAb/rNcp43 – FITC com a proteína nativa as condições da IFI foram as mesmas utilizadas, com exceção da adição do pAb/rNcp43-FITC. Lâminas contendo taquizoítos de *T. gondii* foram utilizadas segundo as normas do fabricante (kit Imuno-con Toxo, WAMA Diagnóstica, Brasil), a fim de investigar a reatividade cruzada do pAb/rNcp43 com este coccídeo. As lâminas foram preparadas com meio de montagem, cobertas com lamínulas e a reação visualizada em microscópio de fluorescência (BX 51, Olympus) a 450nm. Estes experimentos foram repetidos três vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O anticorpo policlonal obtido neste experimento foi avaliado em imunofluorescência, a fim de explorar o potencial de diferenciação de taquizoítos de protozoários. O pAb/rNcp43 apresentou reação com taquizoítos de *N. caninum* quando utilizado como anticorpo primário e conjugado a FITC e não reagiu com taquizoítos de *T. gondii* (Figura 1).

Anticorpos policlonais têm sido utilizados com sucesso em testes de diagnóstico baseados na detecção direta de parasitos por imunofluorescência como na criptosporidiose (CALL et al., 2001) e toxoplasmose (SILVEIRA et al., 2011) parasitoses também causadas por protozoários.

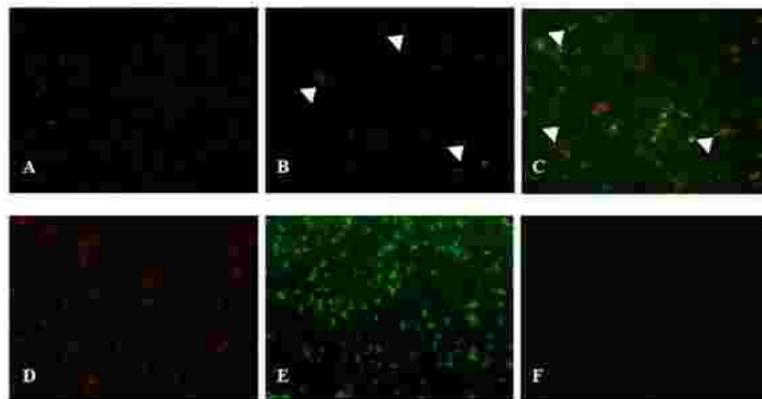


Figura 1: Avaliação do anticorpo policlonal (pAb/rNcp43) e conjugado pAb/rNcp43-FITC por imunofluorescência. Painel A e B: Imunofluorescência indireta (IFI) utilizando pAb/rNcp43 e taquizoítos de *N. caninum*, visualizado sob microscopia de fluorescência com objetiva de 40X e 100X, respectivamente. Painel C: Imunofluorescência utilizando pAb/rNcp43-FITC com taquizoítos de *N. caninum*. Painel D: Imunofluorescência indireta utilizando pAb/rNcp43 com taquizoítos de *T. gondii*. Painel E: Soro bovino positivo para neosporose. Painel F: Soro normal de camundongo.

O padrão da fluorescência exibido pelo pAb gerado contra a proteína rNcp43 foi unicamente no complexo apical de taquizoítos de *N. caninum*, uma vez que o antígeno imunodominante Ncp43 está presente em grânulos densos e roptrias de bradizoítos e taquizoítos de *N. caninum* (HEMPHILL et al., 1996). Este padrão de fluorescência corrobora com os resultados obtidos por SHON et al. (2011) utilizando anticorpos contra proteínas presentes em compartimentos de *Neospora*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos são promissores para desenvolvimento de ensaios diagnósticos uma vez que o anticorpo policlonal registrado neste estudo evidencia o seu potencial uso como ferramenta na diferenciação de *N. caninum* e *T. gondii* em tecidos e fluídos biológicos. Além disso, o pAb/rNcp43 deve ser avaliado em estudos de diagnóstico através da técnica de imunoseparação e em estudos sobre a imunidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 33-38, 2011.

- CALL, J. L.; ARROWOOD, M.; XIE, L. T.; HANCOCK, K.; TSANG, V. C. Immunoassay for viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in turbid environmental water samples. **Journal Parasitology**. v. 87, p. 203-210, 2001.
- CEVENINI, R.; SAMBRI, V.; PILERI, S.; RATTI, G.; LA, P. M.; Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. **Journal of Immunological Methods**. v.140, p. 111-118, 1991.
- 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 193, p. 1259-1263, 1988.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 67, p. 1-59, 1996.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology** . v. 140, p. 1-34, 2006.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**. v. 82, p. 497-504, 1996.
- LATIF, B.M.; JAKUBEK, E. B. Determination of the specificities of monoclonal and polyclonal antibodies to *Neospora*, *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by fluorescent antibody test (FAT). **Tropical Biomedicine**. v. 25, p. 225-231, 2008.
- NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; TRAGOOLPUA, 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.
- PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A.; LOOMIS, E. F.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; MARSH, A. E.; CRAY, C.; BARR, B. C. A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 5, p. 467 – 473, 1998.
- SILVEIRA, C.; VALLOCHI, A. L.; RODRIGUES, S. U.; MUCCIOLI, C.; HOLLAND, G. N.; NUSSENBLATT, R. B.; BELFORT, R.; RIZZO, L. V. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**. v. 95, p. 396-400, 2011.
- SOHN, C. S.; CHENG, T. T.; DRUMMOND, M. L.; PENG, E. D.; VERMONT, S. J.; XIA, D.; CHENG, S. J.; WASTLING, J. M.; BRADLEY, P. J. Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. **PLoS One**. v. 6,p. , 2011.
- UCHIDA, Y.; IKE, K.; KUROTAKI, T.; ITO, A.; IMAI, S. Monoclonal antibodies preventing invasion of *Neospora caninum* tachyzoites into host cells. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 66, p. 1355-1358, 2004.
- WINDSON, B. G. **Conjugation of Antibodies to Fluorescein or Rhodamine**. New Jersey: Humana Press Inc, 2005.