

PRODUÇÃO DE CONJUGADO PARA DETECÇÃO DE *Neospora caninum* ATRAVÉS DE IMUNOFLORESCÊNCIA DIRETA

DIENE DE BORBA PACHECO¹; GIZELE LIMA DE SÁ²; FRANCINE ALVES
SINNOTT²; MARINA AMARAL XAVIER²; LEONARDO GARCIA MONTE²;
CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN³

¹Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas – diene.pchc@hotmail.com

²Laboratório de Imunodiagnóstico, Universidade Federal de Pelotas

³Laboratório de Imunodiagnóstico, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário heteróxico *Neospora caninum*. Atualmente, essa enfermidade é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos leiteiros no Brasil e no mundo (DUBEY et al., 2011). Entretanto, uma variedade de mamíferos, tais como ovinos, equinos e caninos (hospedeiro definitivo) podem ser infectados por *N. caninum* resultando em grandes perdas econômicas para indústria de produtos animais (MOORE et al., 2009).

O diagnóstico direto pode ser realizado através da identificação de lesões microscópicas compatíveis com neosporose, e ensaios que identificam a presença do parasito nos tecidos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a imunohistoquímica utilizando soros hiperimunes contra o antígeno bruto (DUBEY et al., 2011). O diagnóstico indireto utiliza técnicas sorológicas que detectam anticorpos antígeno específicos nos soros suspeitos, sendo a imunofluorescência indireta (IFI) considerada padrão ouro. (DUBEY et al., 2011). Em fetos abortados a detecção direta do parasito é realizada em tecidos e líquidos fetais (CONRAD et al., 1993).

Estudos recentes demonstram a importância de antígenos de superfície celular específicos de *N. caninum* (REGIDOR-CERRILLO et al., 2012). Dentre os potenciais antígenos de *N. caninum*, a proteína NcSRS2 (Nc-p43) (HOWE et al., 2002) foi identificada como um alvo imunodominante presente em ambas as formas do parasito (taquizoítos e bradizoítos) (SON et al., 2001). Ainda, anticorpos gerados contra a Nc-p43, em sua forma nativa e recombinante, não reagem com parasitos do mesmo filo, como por exemplo, o *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2011). Ensaios sorológicos utilizando a Nc-p43 recombinante (rNc-p43) não apresentam reações cruzadas com parasitos do mesmo filo (BORSUK et al., 2010). Nessa perspectiva, anticorpos policlonais (pAbs) gerados contra a rNc-p43 podem ser ferramentas valiosas na detecção direta do parasito. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi a produção de um conjugado de pAb anti rNc-p43 e isotiocianato de fluoresceína (FITC) para a detecção direta do parasito.

2. METODOLOGIA

Para a produção do pAb foi utilizado um coelho (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Albino, com peso médio de 3 kg, imunizado de acordo com protocolo estabelecido por Harlow e Lane (1988). Resumidamente, o animal foi imunizado via subcutânea nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 com 300 µg de rNc-p43, previamente produzida em sistema de expressão procarioto (*Escherichia coli*) segundo Borsuk et al., (2010). O primeiro inóculo foi emulsificado com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, USA), e os demais inóculos com adjuvante

incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, USA). Após confirmação de altos títulos de anticorpos séricos contra rNc-p43 (64.000), o sangue total do animal foi coletado através de punção cardíaca. O soro hiperimune obtido foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando 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 mensurada por espectrofotometria (280nm). O animal utilizado neste estudo foi tratado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de controle de Experimentação Animal (CONCEA). O pAb/rNc-p43 purificado foi titulado por ELISA indireto, utilizando rNc-p43 (50 ng/poço) imobilizada em placas de poliestireno (Nunc polisorp). O pAb/rNc-p43 foi conjugado a FITC, conforme Harlow e Lane, 1988. Para tal, 4,46 mg/mL do pAb/rNc-p43 foi diluído em PBS (pH 7,4), e 1 ml dessa solução foi misturado com 0,2 ml de tampão carbonato bicarbonato (0,5M, pH 9,5) e dialisado por 16 h à 4 °C contra uma solução de NaCl (0,85 %) contendo 1,2 ml de FITC [2,5 mg/ml]. Após, a amostra foi dialisada contra solução de NaCl (0,85 %) durante 3 h, e posteriormente contra tampão PBS (pH 7,5) por 16 h. Então o pAb/rNc-p43-FITC foi analisado por eletroforese (SDS/PAGE) e visualizado sob luz ultra violeta (UV) em transiluminador para avaliar a ligação do anticorpo ao fluoróforo; logo em seguida o gel foi corado com azul de Coomassie e observado novamente. Taquizoítos de *N. caninum*, cepa Nc-Liv (BARBER et al., 1995) foram cultivados conforme protocolo estabelecido por Davison et al. (1997). Os taquizoítos foram ressuspendidos em PBS, contados e fixados em lâminas (2 x 10⁵ taquizoítos/círculo). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em uma solução de metanol e acetona (1:1) por 10 min, bloqueadas com PBS contendo soro fetal bovino 10 %, e adicionado o conjugado pAb/rNc-p43-FITC por 2 h a 37 °C em câmara úmida/escuro. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus IX51). Como controle negativo foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* e soro normal de coelho (SNC). Como controle positivo foi utilizado um soro hiperimune de camundongo (SHM) contra *N. caninum*. O pAb/rNc-p43 foi testado previamente quanto a sua capacidade em identificar a proteína nativa Nc-p43 presente em taquizoítos através de imunofluorescência indireta aplicando-se a metodologia mencionada acima com adição de um anticorpo anti-rabbit conjugado a FITC (Sigma-Aldrich, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O soro hiperimune obtido das inoculações em coelho foi eficiente, sendo possível obter 50 mL de soro total. O pAb/rNc-p43 purificado foi capaz de reconhecer a proteína Nc-p43 na sua forma recombinante, em ELISA apresentando títulos ≥ 128.000 .

A conjugação do pAb/rNc-p43 com FITC pode ser confirmada através de SDS-PAGE (Figura 1). O conjugado pAb/rNc-p43-FITC reagiu com os taquizoítos de Nc-Liv e não reagiu com *T. gondii*, indicando a especificidade do anticorpo pela espécie *N. caninum*, concordando com resultados obtidos por Haldorson et al. (2006) quando utilizou um monoclonal anti Nc-p43 como anticorpo primário. O pAb/rNc-p43/FITC em uma diluição 1:100, imunomarcou o complexo apical de *N. caninum* com intensa fluorescência.

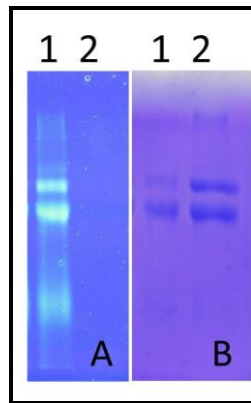


Figura 1: Eletroforese em Gel de poliacrilamida 10% para análise de conjugado FITC. Painei A: 1- pAb/rNc-p43-FITC, 2: pAb/rNc-p43, visualizados sob luz UV; Painei B: 1- pAb/rNc-p43-FITC, 2: pAb-rNc-p43, após coloração com Comassie blue.

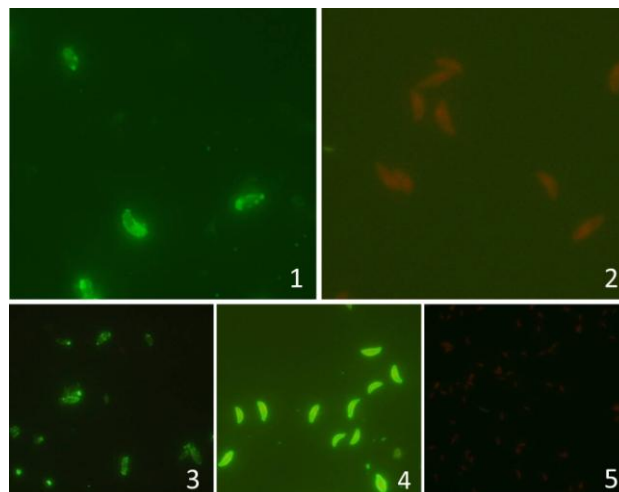


Figura 2: Detecção do complexo apical de taquizoítos de *N. caninum* Imunofluorescência. Painei 1: pAb/rNc-p43-FITC e Nc-Liv; Painei 2: pAb/rNc-p43-FITC e *T.gondii*; Painei 3: pAb/rNc-p43 e Nc-Liv; Painei 4: SHM e Nc-Liv IFI; Painei 5: SNC e Nc-Liv. Observação usando UV, aumento 1000 x (Olympus BX 51).

Nos últimos anos, os relatos científicos de novas metodologias de diagnóstico da neosporose tem sido focados em métodos indiretos de detecção (MORAVEJI et al., 2012; WILKOWSKY et al., 2011; BORSUK et al., 2010), isto provavelmente devido aos baixos custos destes ensaios quando comparados com a detecção do parasito através de PCR, ou ensaios diretos utilizando anticorpos antígeno específicos (MCINNES et al., 2006). Neste trabalho descrevemos a produção de um anticorpo policlonal antígeno específico conjugado ao fluoróforo FITC capaz de detectar a proteína Nc-p43 presente em *N. caninum* o qual pode ser uma ferramenta na detecção direta do parasito em fluidos biológicos e tecidos.

4. CONCLUSÕES

O conjugado pAb/rNc-p43 produzido é uma ferramenta potencial para a detecção específica de *N. caninum*. A próxima etapa do experimento compreenderá a avaliação do conjugado com amostras de fluidos biológicos e tecidos que contenham taquizoítos ou bradizoítos de *N.caninum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBER, J. S., HOLMDAHL, O. J., OWEN, M. R., GUY, F., UGGLA, A., TREES, A. J. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). **Parasitology**. v.111 p.563-8, 1995.
- 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.
- CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; ANDERSON, M. L.; ROWE, I. D.; BONDURANT, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. A.; DUBEY, J. P.; DUHAMIEL, G.; BARR, B. C. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, n.4, p.572-578, 1993.
- DAVISON, H. C.; TREES, A. J.; GUY, F.; OTTER, A.; HOLT, J. J.; SIMPSON, V. R.; JEFFREY, M. Isolation of bovine *Neospora* in Britain. **Veterinary Record**, v.141, n.23, p.607-1997.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.90-108, 2011.
- HALDORSON, G. J.; STANTON, J. B.; MATHISON, B. A.; SUAREZ, C. E.; BASZLER, T. V.; *Neospora caninum*: Antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. **Experimental Parasitology** V. 112 p. 172–178, 2006.
- HARLOW E.; LANE D. Antibodies: A **Laboratory Manual**. 1.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726p.
- HOWE, D. K.; TANG, K.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.3, p.611-615, 2002.
- MCINNES, L. M.; RYAN, U. M.; O'HANDLEY, R.; SAGER, H.; FORSHAW, D.; PALMER, D. G. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 207–213, 2006.
- MOORE, D. P.; PEREZ, A.; AGLIANO, S.; BRACE, M.; CANTON, G.; CANO, D.; LEUNDA, M. R.; ODEON, A. C.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.161, n.1-2, p.122-125, 2009.
- 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, p. 211-217, 2012.
- REGIDOR-CERRILLO, J.; ALVAREZ-GARCIA, G.; PASTOR-FERNANDEZ, I.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. **Journal of Proteomics**, v.75, n.8, p.2306-2318, 2012.
- SON, E.; AHN, H. KIN, J., KIM, D.; NAM, H.; Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p53) of *Neospora caninum*. **The Korean Journal of Parasitology**. v.39. p. 241-246. 2001.
- WILKOWSKY, S. E.; BAREIRO, G.G.; MON, M. L.; MOORE, D. P.; CASPE, G.; CAMPERO, C.; 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, n. 5, p. 971 – 976, 2011.