

## AVALIAÇÃO DE UM ELISA DE BLOQUEIO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora caninum* – ESTUDO PILOTO

FRANCINE ALVES SINNOTT<sup>1,2</sup>; BRUNO MOISÉS DE MATOS<sup>2</sup>, DIENE DE BORBA PACHECO<sup>1,2</sup>; GIZELE LIMÁ DE SÁ<sup>2</sup>; LEONARDO GARCIA MONTE<sup>2</sup>; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Pós Graduação em Parasitologia – fran\_sinnott@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – brunomoisesdematos@gmail.com; diene.pchc@hotmail.com; gezelha@hotmail.com; leonardogmonte@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – hartlebenclaudia@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Neospora caninum*, o qual foi identificado primeiramente por DUBEY et al. (1988). Essa enfermidade acomete uma ampla variedade de mamíferos, como bovinos, equinos, caprinos, ovinos, entre outros animais (DONG et al., 2012). Na bovinocultura, a neosporose é considerada uma das principais causas de abortos no Brasil e no mundo, causando significantes prejuízos econômicos para esse setor (ASMARE et al., 2013). No Brasil, estudos recentes apontam para uma soroprevalência média de 8,7 % em fazendas de gado de corte e 16,1 % em criações de gado de leite (REICHEL et al., 2013).

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado através da identificação do parasito nos tecidos, por exames histológicos, ou pela detecção de anticorpos antígeno – específicos presentes nas amostras de soros suspeitas (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2012). Dentre os ensaios sorológicos, a imunofluorescência indireta (IFI) é considerada o padrão ouro (DUBEY; LINDSAY, 1993). Entretanto, para a realização da IFI, taquizoítos intactos são utilizados como antígeno, por este motivo, o teste apresenta um alto grau de reações cruzadas com o protozoário *Toxoplasma gondii* devido à similaridade morfológica e antigênica com *N. caninum* (DONG et al., 2012).

Com o objetivo de melhorar o diagnóstico da neosporose, antígenos da superfície celular de *N. caninum* vêm sendo utilizados como uma alternativa para o desenvolvimento de novos testes (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2012). Dentre esses antígenos, a proteína imunodominante de superfície, Nc-p43, é considerada um potencial alvo, uma vez que é expressa em ambas as formas de taquizoítos/bradizoítos e exclusiva de *N. caninum*. Nc-p43 em sua forma recombinante (rNc-p43) vem sendo aplicada em diferentes técnicas de diagnóstico para a obtenção de ensaios mais sensíveis e específicos (BORSUK et al., 2011). Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um ELISA de bloqueio (b-ELISA) utilizando rNc-p43 e anticorpos policlonais contra rNc-p43 (pAb/rNc-p43) para o diagnóstico da neosporose.

### 2. METODOLOGIA

Primeiramente, rNc-p43 foi produzida em sistema de expressão procarioto, *Escherichia coli*, segundo SAMBROOK; RUSSEL (2001). Após, a proteína foi purificada em coluna de níquel (GE Healthcare) e quantificada através de *Kit* de purificação BCA (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA). A expressão e a

purificação de rNc-p43 foi confirmada por SDS – PAGE 12 % e posteriormente por *western blot* usando anticorpos anti - 6 × histidina (Sigma-Aldrich, USA).

Para a produção de pAbs contra rNc-p43 (pAb/rNc-p43) um coelho (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Albino, com seis meses de idade e peso de aproximadamente 3 kg foi utilizado. Para tal, imunizações via subcutânea com 100 µg da proteína rNc-p43 foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 (HARLOW; LANE, 1988). A primeira imunização foi emulsificada com adjuvante completo de Freund's (Sigma-Aldrich, USA) e as imunizações subsequentes com adjuvante incompleto de Freund's (Sigma-Aldrich, USA). Após confirmar altos títulos de anticorpos contra rNc-p43 (1:128.000), o sangue total foi coletado por punção cardíaca e o soro hiperimune purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A (GE Healthcare, USA). O pAb/rNc-p43 purificado foi caracterizado através de ELISA indireto e *western blot*, utilizando a rNc-p43, e por IFI utilizando a proteína nativa (taquizoítos fixados em lâminas). O animal utilizado neste estudo foi tratado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para investigar a utilidade do pAb/rNc-p43 no diagnóstico sorológico da neosporose, um b-ELISA foi realizado. Deste modo, microplacas de poliestireno de 96 cavidades (NuncMaxiSorp<sup>®</sup>, NalgeNunc International, USA) foram sensibilizadas com rNc-p43 (50 ng/cavidade) por 1 h a 37 °C. As placas foram bloqueadas com PBS contendo 1 % de soro fetal bovino. Soros bovinos positivos (13) e negativos (11) para *N. caninum*, previamente testados na IFI, foram adicionados não diluídos e em triplicata por 1 h a 37 °C. Como controles negativos, soro normal bovino e soro bovino positivo para toxoplasmose foram utilizados. As cavidades foram novamente lavadas e incubadas com o pAb/rNc-p43 diluído 1:32.000 por 1 h a 37 °C. Após, anticorpo anti – coelho conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foi adicionado e incubado por 1 h a 37°C. A reação foi revelada com solução substrato/cromógena contendo *o-phenylenediamine* (0,4 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio. Passados 15 minutos, as reações foram interrompidas com 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 492 nm usando VICTOR<sup>™</sup> X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA). Os procedimentos do b-ELISA (concentração dos reagentes e período de incubação) foram previamente padronizados. A média das amostras positivas e negativas foram utilizadas para determinar o percentual de inibição de acordo com a seguinte fórmula:  $100 - [(DO \text{ amostra} / DO \text{ controle negativo}) \times 100]$  (GOFF et al., 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pAb/rNc-p43 purificado apresentou altos títulos de anticorpos contra a proteína recombinante em ELISA indireto (1:52.000) e *western blot* (1:6.000, figura 1). Além disso, o pAb/rNc-p43 foi capaz de reconhecer a proteína nativa por IFI (1:100).

Os soros bovinos testados no b-ELISA foram avaliados quanto a capacidade de seus anticorpos, quando positivos para neosporose, bloquearem a ligação do pAb/rNc-p43. As médias dos percentuais de inibição entre os soros positivos e negativos para neosporose apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.0001$ , figura 2). O b-ELISA demonstrou que as amostras de soros positivas para *N. caninum* apresentam anticorpos contra a proteína nativa Nc-p43, e estes são capazes de impedir a ligação do pAb/rNc-p43.

Estes resultados são semelhantes aos descritos por BASZLER et al. (1996), que desenvolveram um ELISA de bloqueio para detecção de anticorpos contra *N.*

*caninum*. Neste estudo foi utilizado antígeno bruto (taquizoítos) para sensibilização das placas de poliestireno. Entretanto, reações cruzadas com soros de animais positivos para *T. gondii* foram observadas. Em nosso experimento não houve um percentual de inibição significativo quando usado soro bovino positivo para toxoplasmose.

Uma vez que nenhum tratamento ou vacina eficaz é disponível para neosporose, há uma necessidade urgente de melhorar as estratégias de controle desta doença (ASMARE et al., 2013). Embora métodos sorológicos venham sendo desenvolvidos para esse propósito, a maioria desses ensaios possuem limitações, incluindo baixa sensibilidade/especificidade e a necessidade de antígenos totais, tornando os ensaios laboriosos e onerosos. O ELISA no formato de bloqueio é um método eficiente para a detecção de anticorpos antígenos específicos e vêm sendo amplamente utilizado para o controle de doenças animais. Além disso, o ensaio não requer anticorpos secundários específicos para as diferentes espécies testadas (BASZLER et al. 1996; BASZLER et al., 2001) e anticorpos IgM e IgG podem ser detectados em um mesmo ensaio. Os resultados obtidos no b-ELISA indicaram uma eficiente detecção de anticorpos antígeno específicos para *N. caninum* sugerindo sua aplicabilidade como teste de diagnóstico.

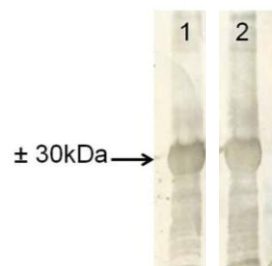


Figura 1: *Western blotting* para a detecção de rNc-p43. Coluna 1: pAb/rNc-p43; Coluna 2: controle positivo utilizando anticorpo anti – 6x histidina.

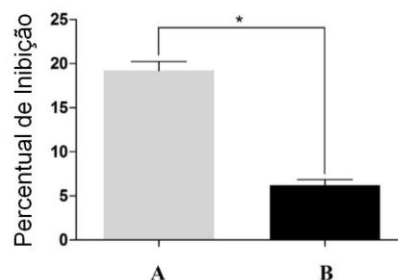


Figura 2: Validação do b-ELISA para a detecção de anticorpos contra *Neospora caninum*. Média dos soros bovinos positivos (A) e negativos (B).

#### 4. CONCLUSÕES

O b-ELISA utilizando a proteína recombinante rNc-p43 e o pAb/rNc-p43 pode ser uma alternativa para o diagnóstico da neosporose. Entretanto, uma maior quantidade de soros será testada para a padronização da técnica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 85-94, 2013.

BASZLER, T. V.; KNOWLES, D. P.; DUBEY, J. P.; GAY, J. M.; MATHISON, B. A.; MCELWAIN, T. F. Serological Diagnosis of Bovine Neosporosis by *Neospora caninum* Monoclonal Antibody-Based Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1423–1428, 1996.

BASZLER, T. V.; ADAMS, S.; VANDER-SCHALIE, J.; MATHISON, B. A.; KOSTOVIC, M. Validation of a Commercially Available Monoclonal Antibody-Based Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibodies to *Neospora caninum* in Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3851–3857, 2001.

BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P. L.; PINTO, L. S.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; BERNE, M. E. A. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 33-38, 2011.

DONG, J.; OTSUKI, T.; KATO, T.; PARK, E. Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. **BioMed Central**, p. 12-19, 2012.

DUBEY, J. P. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.

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

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 Rhoptry-Associated Protein 1 Epitope Specifically Identifies *Babesia bovis*-Infected Cattle. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 10, n. 1, p. 38-43, 2003.

HARLOW E.; LANE D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988

JIMÉNEZ-RUIZ, H; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; SALMAN, H., IRACHE, J. M.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; ORTEGA-MORAA, L. M. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-ε-caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccine**, v. 30, p. 4983– 4992, 2012.

REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, M. A.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 133–142, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.