

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (NcSRS2) DE *Neospora caninum* EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO COMO IMUNOBIOLOGICO PARA TESTES DIAGNÓSTICO

GONÇALES, Relber Aguiar¹; ROOS, Talita Bandeira¹; PINHEIRO, Amanda Fernandes¹; LORENZON, Lucas Bigolin¹; LEITE, Fábio Pereira Leivas²

¹Universidade Federal de Pelotas/Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia; ²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec. relbergoncales@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença emergente, causada pelo protozoário *Neospora caninum* e é considerada a principal causa de abortamentos em bovinos no mundo todo (DUBEY et al., 2002). A importância econômica da infecção por *N. caninum* em rebanhos bovinos é atribuída aos custos associados a abortos, aumento no número de descarte de vacas e diminuição na produção de leite (HÄSLER et al., 2006). Os bovinos infectam-se através da ingestão de oocistos esporulados, tornando-se assim hospedeiros intermediários. Os esporozoítos, ao penetrarem nas células, passam a se chamar taquizoítos e então se dividem rapidamente e invadem várias células causando assim severas lesões em diversos órgãos (MCALLISTER et al., 1998). Segundo Dubey et al., (1988) e Thurmond & Hietala (1997) a infecção no rebanho bovino, pode ocorrer por transmissão vertical, tendo sido sugerida como a principal via de transmissão nesses rebanhos. Assim sendo, a infecção de bovinos por *N. caninum* tem sido alvo de estudos em rebanhos de corte e de leite em todo o mundo (DUBEY et al., 2007). Estimativas indicam que na Califórnia (EUA), a neosporose acarreta um prejuízo em torno de 35 milhões de dólares/ano à indústria de leite (BARR et al., 1997). Recentemente, Cunha Filho (2007) relatou a prevalência da neosporose na região sul do Estado do Rio Grande do Sul, ao avaliar a soropositividade de cães na área urbana e rural.

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado através da detecção de anticorpos específicos, presentes no soro de animais, ou através da identificação do parasito em cortes histológicos (DUBEY, et al., 2007). Entre os métodos sorológicos indiretos estão a Imunofluorescência Indireta (IFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) que podem detectar anticorpos específicos de *N.caninum* (DUBEY, 2003). Estes testes sorológicos apresentam como vantagem uma alta sensibilidade e especificidade sendo indicados para avaliar a exposição e o risco de infecção (PINHEIRO, 2010). Assim, algumas técnicas vêm sendo desenvolvidas para identificar animais infectados e realizar o controle da neosporose em países endêmicos. Dessa forma, propõem-se desenvolver um ELISA Indireto utilizando uma proteína de superfície imunodominante expressa pelo protozoário durante as suas três fases de desenvolvimento.

O objetivo deste trabalho foi expressar a proteína recombinante NcSRS2 produzida em *Escherichia coli* cepa BL21(DE3) Códon Plus Star e avaliar a sua utilização em ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de bovinos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a construção do vetor de expressão em *E. coli* BL21(DE3) Códon Plus Star, o gene da proteína NcSRS2 foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos e clonado em vetor de expressão em *E. coli* (pET201D-TOPO-ncsrs2). A expressão da proteína recombinante foi induzida em 500 mL de meio LB (Luria Bertani) com IPTG 0,5M por 4h a 37°C junto à cepa controle não transformada. A proteína recombinante foi purificada de forma manual utilizando uma coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, sendo a eluição realizada nas concentrações de elution 10%, 20%, 30%, 40% e 100%. A pureza da mesma foi observada em eletroforese no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), sendo sua concentração determinada pelo método de BRADFORD. A especificidade da proteína recombinante foi confirmada por *Western blotting* utilizando-se anticorpo monoclonal anti-histidina.

A proteína NcSRS2 recombinante (rNcSRS2) foi utilizada no teste imunoenzimático indireto (ELISA) numa concentração de 100ng/μL para sensibilizar as placas de poliestireno, a fim de avaliar a titulação de anticorpos em bovinos. Sendo assim, utilizou-se 76 soros de bovinos (1:100) e um anti-soro IgG total de bovino conjugado com peroxidase (1:8000), ambos diluídos em tampão PBS-T. A reação foi revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) e a densidade óptica (OD) mensurada a 492nm em leitor de ELISA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína NcSRS2 foi expressa com sucesso em *E.coli* cepa BL21(DE3) Códon Plus Star e esta sendo utilizada em inquéritos epidemiológicos para determinar contato prévio de bovinos, ovinos e caninos com *N. caninum* através da técnica de ELISA, *Western blotting* entre outras. Nas Figuras 1 e 2 podem ser observados os resultados promissores obtidos até o momento.



Figura 1: *Western blotting* da proteína NcSRS2 recombinante expressa em *E.coli*. 1A) Soro bovino negativo; 1B) Soro bovino positivo. A seta indica a banda no soro positivo.

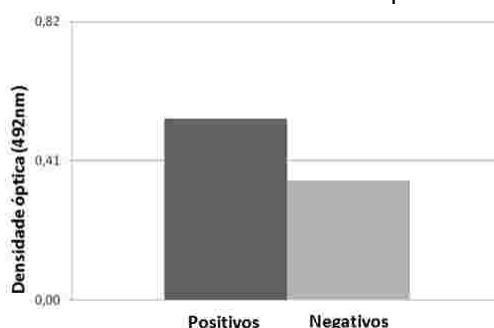


Figura 2: Média da densidade óptica obtida no ELISA utilizando a proteína NcSRS2 recombinante expressa em *E.coli* com soros positivos de bovinos naturalmente infectados a campo (coluna escura) e negativos (coluna clara) para Neosporose. Os dados representam as médias (+/-erro padrão da média) das densidades ópticas nos animais.

Um total de 76 amostras de soros de bovinos foram testados no ELISA com NcSRS2 recombinante. Os soros testados foram provenientes de duas regiões distintas do Brasil: Rio Grande do Sul (cedidos pelo Laboratório de Protozoologia da UFPel) e Mato Grosso do Sul (cedidos pela EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande).

Na figura 3A está representada a distribuição da frequência das amostras positivas e negativas por IFI em bovinos. Baseado na análise ROC (Figura 3A e 3B), o ponto de corte de DO=0,41 para as amostras de bovinos foi escolhido como o limiar para distinguir entre amostras positivas e negativas, produzindo uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 97,96%.

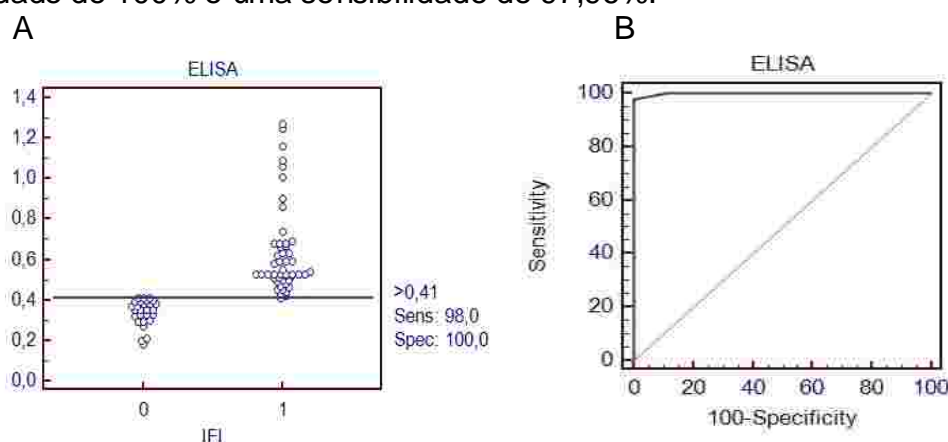


Figura 3: A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) do ELISA-NcSRS2 mostrou 49 soros de bovinos positivos e 27 negativos, confirmados por IFI. (A) Distribuição das frequências dos resultados positivos confirmados (1), com resultados negativos dos soros (0). As amostras foram consideradas positivas quando o valor de ponto de corte foi maior a 0,41 DO dos valores médios do ELISA. (B) gráfico ROC. Área sob a curva = 0,999 (0,00130), intervalo de confiança 95% entre 0,950 a 1,000 para bovinos.

Utilizando este ponto de corte (DO > 0,41), o valor negativo do teste preditivo variou de 99,8% para 84,5% (10% a 90% de prevalência) e o valor preditivo positivo foi de 100%, dependendo da prevalência da doença em uma determinada área (Figura 4).

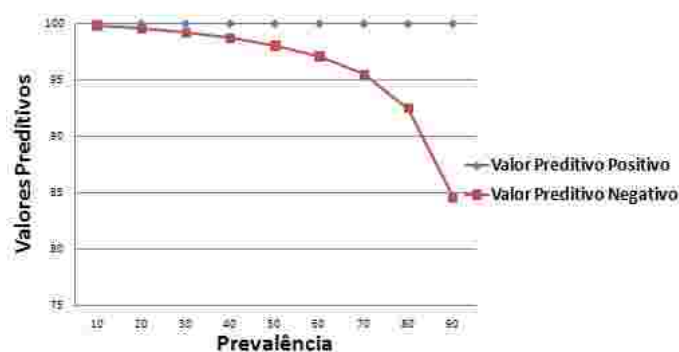


Figura 4: Valores Preditivos Positivo e Negativo: Valores preditivos negativo (quadrados) e positivo (diamantes) associados com ELISA-NcSRS2 para diferentes níveis de prevalência da neosporose. Os valores foram determinados por análise de ROC com base em uma média de absorbância de 0,41 para os valores médios do ELISA.

4 CONCLUSÃO

A proteína recombinante NcSRS2 está sendo expressa e purificada com sucesso em sistema eucarioto utilizando *Pichia pastoris* e procarioto utilizando a cepa de *E.coli* BL21(DE3) Códon Plus Star, a fim de comparar e avaliar o melhor teste imunodiagnóstico para neosporose quanto ao resultado obtido nos testes de ELISA, *Western blotting* entre outros. Com o objetivo de se obter uma proteína com maior sensibilidade e especificidade e melhor rentabilidade para ser utilizada em testes diagnósticos em grande escala com uma relação custo-benefício adequada. APOIO: CAPES, FAPERGS.

5 REFERÊNCIAS

BARR, B. C., et.al., Neosporosis - report of the International Neospora Workshop. **Compedium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, v.19, p.120-144, 1997.

CUNHA FILHO, N. A., Ocorrência de anticorpos para *Neospora caninum* em cães da área urbana e rural do sul do Rio Grande do Sul. 2007. 77f. Dissertação-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

DUBEY, J.P., et.al., A Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P., et.al., Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, 32, 929-946, 2002.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Veterinary Parasitology**, v.67, n.1, p. 1-59, 2003.

DUBEY, J. P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L. M., Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.

HÄSLER, B.; REGULA, G.; STÄRK, K. D.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, n.3-4, p. 230-253, 2006.

McALLISTER, M. M., et.al., Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28,p.1473-1478, 1998.

PINHEIRO, A. F., Desenvolvimento de ELISA para o diagnóstico da neosporose. 2010. 85f. Dissertação-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

THURMOND, M. C. & HIETALA, S. K., Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal Veterinary Res** 58, p.1381-1385, 1997.