

## DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA USANDO O ANTÍGENO IMUNODOMINANTE NcSRS2 DE *Neospora caninum* EXPRESSO EM *Pichia pastoris*

**Pinheiro, Amanda Fernandes<sup>1</sup>, BORSUK, Sibeles<sup>2</sup>, ROLOFF, Bárbara  
Couto<sup>1</sup>, GONÇALES, Relber Aguiar<sup>1</sup>, ANDREOTTI, Renato<sup>3</sup> e LEITE, Fábio  
Pereira Leivas<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas/Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia;  
<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico - cDTEC.  
<sup>3</sup>EMBRAPA Gado de Corte, BR 262, km 4, CP 154, Campo Grande, MS, Brasil

[afpfarmacia@gmail.com](mailto:afpfarmacia@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

A neosporose, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, é responsável por importantes perdas econômicas para a pecuária de corte e de leite em todo o mundo. Isto se deve principalmente ao aborto e a redução na produção de leite (Anderson et al. 2000). Problemas devido à infecção adquirida naturalmente por *N. caninum* também foram relatados em outras espécies de animais, incluindo as ovelhas (Dubey et al 1990). Os cães são essenciais no ciclo de vida deste parasita (Dubey et al. 2007), pois eles são considerados hospedeiros intermediário e definitivo de *N. caninum*, portanto, são de grande importância epidemiológica na transmissão horizontal deste protozoário a outros animais (Gondim et al. 2004). Vários estudos têm sido realizados para identificar e caracterizar os componentes moleculares antigênicos de *N. caninum*, a fim de aumentar o desempenho do diagnóstico sorológico, bem como para demonstrar os mecanismos de sua interação com o hospedeiro (Pare et al. 1995).

A antigenicidade dos antígenos específicos do filo Apicomplexa, que inclui o *Neospora* sp., é importante para evitar reações cruzadas com parasitas do mesmo filo e assim aumentar a especificidade dos testes sorológicos que utilizam estes antígenos (Dubey et al. 2003). A NcSRS2 é uma proteína de superfície imunodominante presente nos estágios de bradizoítos e taquizoítos de *N. caninum* (Fuchs et al. 1998) e tem o potencial para o desenvolvimento de testes sorológicos específicos para a neosporose. Esta proteína já foi expressa de diferentes formas, incluindo a *Escherichia coli* e o sistema de baculovirus (Borsuk et al. 2011; Nishikawa et al. 2001). A abordagem deste estudo foi utilizar o sistema de expressão eucarioto de *Pichia pastoris* para a produção da proteína NcSRS2 recombinante. Este sistema de expressão em levedura tem demonstrado ser geneticamente estável, pois, uma vez transformadas, são capazes de crescimento em meios de cultura relativamente simples e de produção em escala industrial (Cereghino et al. 2002).

O objetivo deste estudo, foi desenvolver um ELISA utilizando a proteína NcSRS2 de *N. caninum* expressa em *P. pastoris* e testar a

capacidade desta proteína ser reconhecida pelos anticorpos das principais espécies infectadas naturalmente como os bovinos, ovinos e cães domésticos.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a construção do vetor de expressão em *P. pastoris*, o gene que codifica para a proteína NcSRS2, foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos e clonado em vetor de expressão em *P. pastoris* (pPICZ B-ncsrs2). A expressão da proteína recombinante foi induzida com metanol em 1000mL de meio BMMY por cinco dias em fermentador. A proteína recombinante foi precipitada com sulfato de amônio 70%, dialisada e posteriormente liofilizada. 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 anticorpos monoclonais específicos para as espécies analisadas.

A proteína NcSRS2 recombinante (rNcSRS2) foi utilizada no teste imunoenzimático indireto (ELISA) numa concentração de 50ng/μL por cavidade para sensibilizar as placas de poliestireno, a fim de avaliar a titulação de anticorpos em bovinos, ovinos e cães. Sendo assim, utilizou-se 264 soros de bovinos (1:100), 110 soros ovinos (1:100) e 65 soros caninos (1:100) e os anti-soros IgG total de bovino, ovino e canino conjugado com peroxidase (1:4000) sendo ambos diluídos em tampão PBS-T. A reação foi desenvolvida com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) e a densidade ótica (OD) mensurada a 492nm em leitor de ELISA.

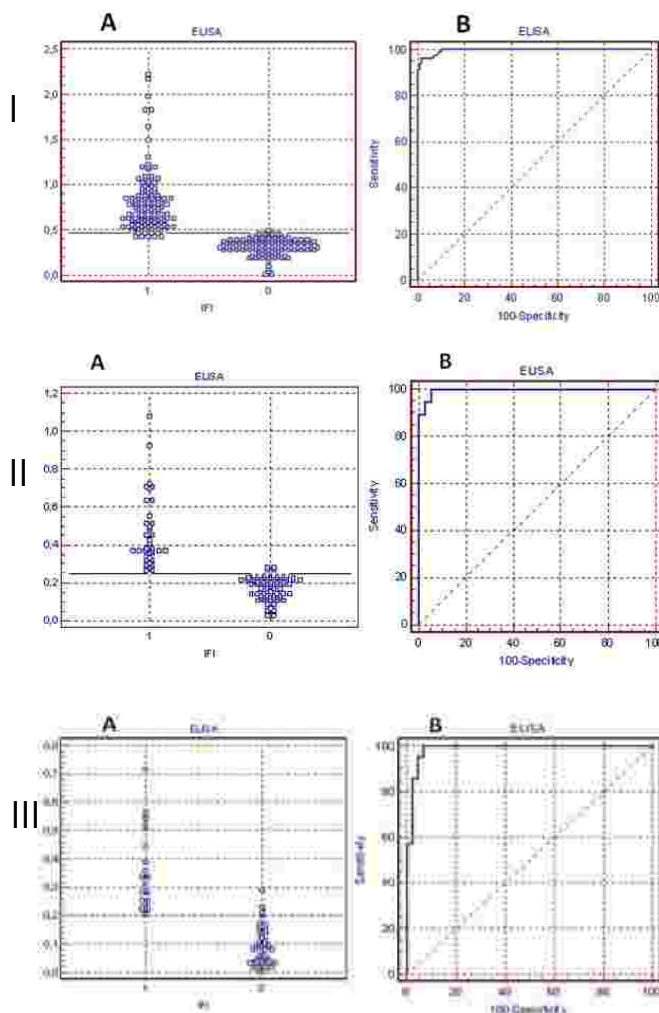
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*P. pastoris* foi transformada com sucesso e a expressão da proteína NcSRS2r foi confirmada por *Western blotting*, utilizando soros de bovinos, ovinos e caninos infectados naturalmente por *N.caninum*. Sugerindo que a proteína recombinante apresenta uma conformação semelhante à proteína nativa do protozoário.

A aferição do ELISA-NcSRS2 foi alcançada utilizando 264 soros bovinos, onde 133 foram positivos e 131 amostras negativas, para ovinos nós usamos 110 soros com 37 amostras positivas e 73 negativas e para caninos nós testamos 65 amostras de soros onde 21 foram positivos e 44 negativos. As amostras foram previamente testadas e consideradas positivas ou negativas por IFI. Os soros testados foram provenientes de duas regiões distintas do Brasil: Rio Grande do Sul (cedidos pelo Laboratório de Protozoologia da UFPeI) e Mato Grosso do Sul (cedidos pela EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande).

Baseado na análise ROC, o ponto de corte de DO=0,46 para as amostras de bovinos foi escolhido como o limiar para distinguir entre amostras positivas e negativas, produzindo uma especificidade de 98,5% e uma

sensibilidade de 100% (Figura 1). Em ovinos, considerando a  $DO=0,25$  foi determinada uma especificidade de 94% e uma sensibilidade de 100%. Utilizando este ponto de corte ( $DO > 0,25$ ). Na população de cães foi usada a mesma análise ROC, baseado no ponto de corte  $DO=0,21$  foi determinada uma especificidade de 93,3% e uma sensibilidade de 100%. Os resultados de sensibilidade e especificidade do ELISA desenvolvido foi satisfatório para os soros de bovinos, ovinos e cães testados, demonstrando que este teste pode ser utilizado para o diagnóstico desta parasitose.



**Figura 1:** Análise ROC do ELISA-NcSRS2 usando soros bovinos, ovinos e de cães (A) Distribuição da frequências de soros confirmados positivos (1) e confirmados negativos (0). (B) ROC plot. I- Soros de bovinos, as amostras foram consideradas positivas quando o ponto de corte foi maior ou igual a 0.46. II- Soros de ovinos, as amostras foram consideradas positivas quando o ponto de corte foi maior ou igual a 0.25. III- Soros de cães, as amostras foram consideradas positivas quando o ponto de corte foi maior ou igual a 0.21.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados observados neste estudo sugerem que a proteína recombinante expressa em *P. pastoris* pode ser utilizada como um antígeno para o desenvolvimento de métodos imunodiagnósticos para detectar a presença de *N. caninum* nas três espécies mais expostas a esta parasitose.

## 5 REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. L., A. G. ANDRIANARIVO, and P. A. CONRAD. Neosporosis in cattle. **Anim Reprod. Sci.** 60-61: 417-431, 2000

BORSUK, S., R. ANDREOTTI, F. P. LEITE, P. L. DA SILVA, S. SIMIONATTO, C. P. HARTLEBEN, M. GOETZE, L. M. OSHIRO, M. F. MATOS, and M. E. BERNE. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Vet. Parasitol.** 177: 33-38, 2011

CEREGHINO, G. P., J. L. CEREGHINO, C. ILGEN, AND J. M. CREGG. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13: 329-332, 2002

DUBEY, J. P. and D. S. LINDSAY. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest** 2: 230-233, 1990

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Vet. Parasitol.**, 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

FUCHS, N., S. SONDA, B. GOTTSTEIN, and A. HEMPHILL. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. **J. Parasitol.** 84: 753-758, 1998

GONDIM, L. F., M. M. MCALLISTER, N. E. MATEUS-PINILLA, W. C. PITT, L. D. MECH, and M. E. NELSON. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **J. Parasitol.** 90: 1361-1365, 2004

NISHIKAWA, Y., Y. KOUSAKA, K. TRAGOOLPUA, X. XUAN, L. MAKALA, K. FUJISAKI, T. MIKAMI, and H. NAGASAWA. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. **J. Clin. Microbiol.** 39: 3987-3991, 2001

PARE, J., S. K. HIETALA, and M. C. THURMOND. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **J. Vet. Diagn. Invest** 7: 273-275, 1995