

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

Produção de insumos para o imunodiagnóstico da neosporose

Diene de Borba Pacheco

Pelotas, 2014.

DIENE DE BORBA PACHECO

Produção de insumos para o imunodiagnóstico da neosporose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Cláudia Pinho Hartleben

Co-Orientadora: Daiane Drawanz Hartwig

Co-Orientador: Leonardo Garcia Monte

Pelotas, 2014.

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P116p Pacheco, Diene de Borba

Produção de insumos para o imunodiagnóstico da neosporose / Diene de Borba Pacheco. – 47f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Cláudia Pinho Hartleben ; co-orientador Daiane Drawanz Hartwig e Leonardo Garcia Monte.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Leonardo Garcia Monte, Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a Sibeles Borsuk, Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Thaís Farias Collares, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e por guiar meus passos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao Centro de Biotecnologia onde foi desenvolvido todo o trabalho experimental, pela contribuição e receptividade.

À minha orientadora, Cláudia Pinho Hartleben, e aos co-orientadores Daiane Drawanz Hartwig e Leonardo Garcia Monte pela contribuição.

Aos meus pais, Vera e Eliseu, pelo amor e pela minha formação pessoal, minhas irmãs Tássila e Louise, por todo apoio emocional e dedicação.

Ao meu noivo, Rudi, por toda paciência nos momentos de ausência e todo apoio e amparo nos momentos de dificuldade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunodiagnóstico pela excelente convivência e contribuição, em especial a Gizele e a Bianca pela amizade incondicional e ajuda incansável.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

PACHECO, Diene de Borba. **Produção de insumos para o imunodiagnóstico da neosporose** 2014 47f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Neosporose é a doença causada pelo parasito apicomplexa *Neospora caninum*, o qual é intimamente relacionado a *Toxoplasma gondii*. A infecção por *N. caninum* representa uma importante causa de falha reprodutiva em ovinos, caprinos, equinos e bovinos ao redor do mundo. O diagnóstico da neosporose é baseado na detecção de anticorpos específicos contra o patógeno em soros, ou a presença de cistos teciduais em animais. No entanto, as semelhanças morfológicas e a possível reatividade sorológica cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* pode resultar no diagnóstico errôneo. Neste estudo, a proteína de superfície Ncp-43 de taquizoítos de *N. caninum*, foi expressa de forma recombinante em *Escherichia coli* e utilizada para produção de anticorpos policlonais (pAb). O pAb foi purificado e conjugado a peroxidase (HRP) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) para detectar as proteínas recombinantes e nativas Ncp-43, respectivamente. pAb e pAb/HRP foram capazes de reconhecer rNcp-43, o que foi avaliado pelas técnicas de *Dot blot* e ELISA enquanto pAb/FITC se mostrou eficiente na imunomarcação do complexo apical de taquizoítos. Um ensaio imunoenzimático de bloqueio (b-ELISA) foi realizado para avaliar a performance do pAb/HRP como ferramenta de diagnóstico. A porcentagem de inibição média para as amostras de pool de soros positivos e o pool de negativos de bovinos com neosporose foi significativamente diferente ($P < 0,0001$). Estes resultados sugerem que o pAb pode ligar-se aos mesmos epítomos da Ncp-43 que os anticorpos anti-*N. caninum* de amostras positivas testadas. O b-ELISA utilizando o pAb/HRP representa uma opção interessante aos testes de diagnóstico disponíveis para a neosporose, uma vez que menos passos estão envolvidos na sua realização e seu formato evita a reatividade cruzada com anticorpos anti-espécie específicos. Em resumo, este trabalho descreve a produção de anticorpos contra *N. caninum*, e avalia o potencial dessas ferramentas para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos para neosporose.

Palavras chaves: *Neospora caninum*, neosporose, ELISA, Ncp-43, diagnóstico.

ABSTRACT

PACHECO, Diene de Borba. **Development of immunochemical assays for the immunodiagnosis of neosporosis.** 2014 47f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Neosporosis is a disease caused by the apicomplexan parasite *Neospora caninum*, which is closely related to *Toxoplasma gondii*. *N. caninum* infection represents an important cause of reproductive failure in sheep, goats, horses, and cattle worldwide. The diagnosis of neosporosis is based on the detection of pathogen-specific antibodies in animal sera or the presence of tissue cysts. However, morphological similarities and serological cross-reactivity between *N. caninum* and *T. gondii* can result in the misdiagnosis. In this study, the *N. caninum* tachyzoite surface protein Ncp-43 was expressed in a recombinant form to elicit polyclonal antibodies (pAb) response. The pAb was purified and conjugated to horseradish peroxidase (HRP) or fluorescein isothiocyanate (FITC) to detect the recombinant and native Ncp-43 proteins, respectively. The pAb and pAb/HRP were able to recognize rNcp-43 by Dot blot and ELISA, and pAb/FITC immunolabeled the apical complex of tachyzoites. A blocking *enzyme-linked immunosorbent assay* (b-ELISA) was performed to evaluate pAb/HRP as a diagnostic tool. The mean percent inhibition for the positive and negative serum samples from cattle with neosporosis was significantly different ($P < 0.0001$). These results suggest that the pAb may bind to the same epitopes of Ncp-43 as anti-*N. caninum* antibodies in the positive samples tested. The b-ELISA using the pAb/HRP can facilitate diagnostic testing for neosporosis, since fewer steps are involved and cross-reactivity with secondary antibodies is avoided. In summary, this report describes the production of antibodies against *N. caninum*, and evaluates the potential of these tools for the development of new diagnostic tests for neosporosis.

Keywords: *Neospora caninum*, neosporosis, ELISA, Ncp-43, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ensaio de <i>Dot blot</i> utilizando pAb ou pAb conjugado a HRP	31
Figura 2	Detecção do complexo apical de taquizoítos de <i>N. caninum</i> por imunofluorescência direta.....	32
Figura 3	ELISA de bloqueio utilizando pAb/HRP.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

b-ELISA - Ensaio imunoenzimático de bloqueio

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DO - Densidade óptica

ELISA - Ensaio imunoenzimático

Fig - Figura

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

g - Força da gravidade

h - Hora

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HRP - Peroxidase

IF - Imunofluorescência

IFD - Imunofluorescência direta

IFI - Imunofluorescência indireta

IgG - Immunoglobulina G

IL - Interleucina

IMAC - Íons metálicos imobilizados

INF-γ - Interferon gama

IPTG - Isopropilα-D-thiogalactoside

M - Molar

mAbs - Anticorpos monoclonais

mM - Milimolar

NcSRS2 - Sequencia codificadora para antígeno de superfície de *Neospora caninum*

nm - Nanômetro

pAb - Anticorpo policlonal

pAb/FITC - Anticorpo policlonal conjugado a isotiocianato de fluoresceína

pAb/HRP - Anticorpo policlonal conjugado a peroxidase

PBS - Tampão fosfato salino

PBS-T - Tampão fosfato salino com 0.05% de Tween 20

rNcp-43 - Proteína Ncp-43 recombinante

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SRS - Sequências relatadas de superfície

Th1 - Linfócitos T auxiliares 1

Th2 - Linfócitos T auxiliares 2

VERO - Células de rim de macaco africano

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrômetro

SUMÁRIO

1 Introdução	10
1.1 Neosporose	10
1.2 Ciclo Biológico	10
1.3 Epidemiologia	11
1.3.1 Transmissão	12
1.4 Resposta imune	13
1.5 Gene NcSR2 (proteína Ncp-43)	14
1.6 Diagnóstico	15
2 Justificativa	17
3 Objetivo	18
3.1 Objetivos específicos	18
4 Artigo	19
5 Conclusão	34
Referências	35
Anexo	42

1 Introdução

1.1 Neosporose

O agente infeccioso causador da neosporose é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae, gênero *Neospora* e espécie *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988). Entretanto até 1988 foi erroneamente diagnosticado como *Toxoplasma gondii* devido a grande similaridade. A neosporose tem sido confirmada como uma das principais causa de abortos e mortalidade neonatal em bovinos, ovinos, caprinos, equinos e cervídeos (DUBEY, 2003). Os canídeos infectados apresentam desordens neuromusculares severas, principalmente aqueles com infecção congênita (DUBEY et al., 1998).

A importância econômica dessa enfermidade na bovinocultura está diretamente relacionada as falhas reprodutivas e descarte precoce de fêmeas (HASLER et al., 2008). Em muitos casos ocorre o nascimento de animais clinicamente saudáveis, no entanto cronicamente infectados, os quais são de suma importância na manutenção do ciclo do parasito em rebanhos (DUBEY, 2003).

A neosporose afeta tanto o gado de corte como o de leite, tendo sido registrada em todos os continentes, logo, grande parte dos rebanhos vem sendo constantemente expostos ao *N. caninum* (CARDOSO et al., 2012; DUBEY et al., 2011b; REICHEL et al., 2013). Estimativas indicam que no Brasil os prejuízos relacionados à neosporose variam de 51,3 a 101 milhões de dólares em rebanhos de leite e corte (REICHEL et al., 2013).

1.2 Ciclo Biológico

Os canídeos são os hospedeiros definitivos do *N. caninum*, e a eliminação de oocistos desse parasito foi confirmada até o momento em cães (*Canis lupus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (*C. latrans*) (GODIM et al., 2004), dingos (*C. lupus dingo*) (KING et al., 2010), e lobos cinzentos (*C. lupus lupus*) (DUBEY et al., 2011a). Uma ampla gama de outros mamíferos é suscetível a este parasito assumindo importância como hospedeiros intermediários.

Vários aspectos do ciclo biológico deste parasito não estão completamente esclarecidos, principalmente com relação à fase sexuada que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, no entanto, pode-se afirmar que o período pré-patente é de cinco a oito dias após a ingestão dos cistos teciduais pelos canídeos (LINDSAY et al., 2000). Ao longo do ciclo o parasito se apresenta nos estágios de taquizoítos e bradizoítos, fases intracelulares encontradas nos hospedeiros definitivos e intermediários, e em oocistos, que são exclusivos de hospedeiros definitivos e eliminados juntamente com as fezes desses animais (MCALLISTER et al., 1998). A esporulação dos oocistos ocorre no ambiente, sendo esta a forma infectante para hospedeiros intermediários (DUBEY, 2003). Há relato da presença de taquizoítos de *N. caninum* em diversos tipos de tecidos e células como macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, miócitos, células epiteliais dos túbulos renais e hepatócitos, no entanto o parasito demonstra predileção pelo sistema nervoso (DUBEY et al., 2011b; HEMPHILL, 1999).

A resposta imune do hospedeiro e outros fatores fisiológicos estimulam a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos, os quais são menores, apresentando metabolismo e multiplicação mais lentos, formando cistos teciduais (PETERS et al., 2001), comumente encontrados no encéfalo, medula, nervos e retina, podendo permanecer durante toda a vida do hospedeiro sem grandes manifestações clínicas (GOODSWEN et al., 2013).

1.3 Epidemiologia

A associação do parasito *N. caninum* a abortos bovinos foi comprovada em estudos soroepidemiológicos realizados em diferentes países, os quais relatam taxas de prevalência variando de 10 a 60% (DUBEY et al., 2011b; REICHEL et al., 2013). O hospedeiro definitivo representa um papel de destaque na cadeia epidemiológica da neosporose devido a grande frequência da infecção na população de canídeos combinada à ausência de sinais clínicos na maioria dos casos (AL-QASSAB et al., 2010; REICHEL et al., 2007) e associação direta destes animais com os rebanhos (CORBELLINI et al., 2006).

No Brasil, os dados desta parasitose em rebanhos bovinos de corte e de leite foram relatados em estudos de prevalência realizados nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Goiás, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina

e São Paulo, com taxas de prevalência que variaram de 6 a 58% (ANDREOTTI et al., 2010; BENETTI et al., 2009; LOCATELLI-DITTRICH et al., 2001; MELO et al., 2006; MOURA et al., 2011; MUNHOZ et al., 2006; PIAGENTINI et al., 2012; RAGOZO et al., 2003). Em levantamento soroepidemiológico de cães da região sul do Rio Grande do Sul a prevalência da neosporose foi de 15,62%, sendo os cães da zona rural os que apresentaram maior percentual de soropositividade (DA CUNHA FILHO et al., 2008; SHARMA et al., 2008).

1.3.1 Transmissão

A primeira observação de transmissão vertical em canídeos ocorreu na Noruega em três ninhadas sucessivas, que apresentaram problemas neurológicos similares a sintomas observados em animais infectados por *T. gondii* (BJERKAS et al., 1984). A porta de entrada para o *N. caninum* é o trato digestivo do hospedeiro definitivo, pois a infecção ocorre pela ingestão de tecidos de animais infectados contendo cistos, ou pela ingestão de oocistos esporulados presentes em água ou alimentos contaminados (BARR et al., 1993). A transmissão horizontal é mais frequente entre cães do que a vertical, justificando as elevadas taxas de soroprevalência encontradas nesta espécie (BARBER et al., 1998). A presença de oocistos em fezes de cães foi confirmada após a ingestão de cistos teciduais presentes em bovinos (DIJKSTRA et al., 2002), bubalinos (RODRIGUES et al., 2004), ovinos (PENA et al., 2007) e cervídeos (VIANNA et al., 2005).

Em hospedeiros intermediários a transmissão pode ser horizontal, através da ingestão de oocistos esporulados presentes nas pastagens ou água, ou vertical através da infecção transplacentária por taquizoítos. Em bovinos a principal via de transmissão é a transplacentária e dependendo do estágio gestacional pode ocorrer aborto, natimorto ou ainda o nascimento de um bezerro clinicamente saudável, porém cronicamente infectado (SENGUPTA et al., 2012). A transmissão lactogênica foi possível em condições laboratoriais, porém, não há confirmação da ocorrência desse tipo de transmissão naturalmente (DAVISON et al., 2001).

A taxa de infecção transplacentária em bovinos pode chegar a uma frequência de 95% dos casos, sendo a rota de transmissão responsável pela manutenção e expansão da infecção no rebanho devido às sucessivas passagens

de geração em geração (DAVISON et al., 2001). A transmissão transplacentária exógena ocorre quando a fêmea sofre a primo-infecção durante a gestação, através da ingestão de oocistos, o que culmina com a infecção do feto. Já a transmissão transplacentária endógena ocorre quando uma fêmea cronicamente infectada, possivelmente de forma congênita, sofre reativação dos cistos durante a gestação, ocasionando a reversão de bradizoítos em taquizoítos que atingem o feto (MILLER et al., 2002).

1.4 Resposta imune

Existem vários fatores não esclarecidos acerca da resposta imune induzida frente à infecção por *N. caninum*, porém mecanismos de reconhecimento e estímulo de hospedeiros infectados por outros apicomplexas intimamente relacionados, como *T. gondii*, podem elucidar a interação parasito hospedeiro na neosporose.

Em uma primo infecção o mecanismo de defesa frente o neospora requer uma resposta imune inata e adaptativa, envolvendo altos níveis de interleucina 12 e INF- γ e uma razão aumentada de IgG2:IgG1, indicando uma predominância da resposta Th1 (ALMERIA et al., 2012; ELLIS et al., 2010; OROZCO et al., 2013). Macrófagos ativados via INF- γ produzem espécies ativas de oxigênio, tal como óxido nítrico que auxilia no controle da fase aguda da infecção (BOYSEN et al., 2006; STASKA et al., 2003; WILLIAMS et al., 2006). Esses fatores provavelmente são responsáveis por induzir a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos, levando à formação de cistos teciduais (WILLIAMS et al., 2009). Esta conversão desempenha um papel fundamental no estabelecimento da fase crônica da infecção (LYONS et al., 2002).

O papel crucial do INF- γ e da IL 12 foi confirmado em experimentos nos quais camundongos tratados com anticorpos anti-INF- γ e anti-IL12 foram infectados por *N. caninum*, e apresentaram maior suscetibilidade ao parasito (KHAN et al., 1997). Além disso, animais deficientes para estas citocinas apresentaram elevadas cargas parasitárias devido à multiplicação exacerbada de taquizoítos em diversos órgãos resultando em altas taxas de mortalidade. A importância das células T foi confirmada experimentalmente, quando camundongos atímicos infectados por *N. caninum* apresentaram 100% de mortalidade (SHIBAHARA et al., 1999).

Anticorpos resultantes da infecção desempenham um papel auxiliar em infecções posteriores participando da neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares (INNES et al., 2002). Estudos sugerem que a imunidade protetora pode ser alcançada devido a uma infecção anterior, e pode ser mantida, através de mecanismos não elucidados, pois animais com evidências de exposição prévias tem menor probabilidade de aborto do que animais com infecção primária (MCALLISTER et al., 2000).

Os bovinos, de forma geral, apresentam soroconversão rápida, com altos títulos de anticorpos IgG2 e tendem a manter esses títulos durante um longo período (ANDREOTTI et al., 2010; DIJKSTRA et al., 2003).

1.5 Gene *NcSRS2* (proteína Ncp-43)

A identificação de diferenças gênicas entre *T. gondii* e *N. caninum*, possibilita a distinção entre essas duas espécies, e contribui na compreensão de suas sutis diferenças fenotípicas (HEMPHILL, 1999). Dentre as sequências gênicas descritas até o momento a maioria codifica antígenos que encontram-se na superfície do parasito, como *NcSRS2* que codifica o antígeno de membrana Ncp-43, e apresenta 44% de homologia com *TgSRS2* em *T. gondii* (HOWE et al., 1998), no entanto ensaios imunológicos que utilizam esta proteína como alvo não apresentam reações cruzadas com *T. gondii* (BORSUK et al., 2011; DONG et al., 2012).

Estudos *in vitro* demonstram que o bloqueio desta proteína limita a capacidade de adesão e penetração de células hospedeiras pelo parasito salientando a importância desta proteína nestes processos (DUBEY et al., 2011b; LEKUTIS et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2002). Além disso, estudos *in vivo* também demonstraram que a proteína rNcp-43 tem efeitos protetores contra a encefalite e a transmissão transplacentária (NISHIKAWA et al., 2002), enquanto vacinas que utilizam antígenos totais do parasito demonstram eficácia abaixo de 25% (WESTON et al., 2012). Estes resultados corroboram com estudos onde a proteína Ncp-43 foi capaz de gerar uma forte resposta imune em animais infectados, sendo portanto, um candidato interessante para diagnóstico e antígeno da vacinal (JUNG et al., 2004).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado na identificação de lesões microscópicas compatíveis com a patologia, e ensaios que identificam a presença do parasito nos tecidos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a imuno-histoquímica utilizando soros hiperimunes contra o antígeno bruto (DUBEY et al., 2011b). A confirmação da neosporose como causa do aborto não deve ser baseada somente no método sorológico (PEREIRA-BUENO et al., 2003; SAGER et al., 2001). O resultado sorológico positivo em um animal com histórico de aborto indica somente que ocorreu exposição do animal ao parasito, sendo necessário demonstrar o protozoário no feto e, se possível, incluir os dados histopatológico para confirmar o diagnóstico (PEREIRA-BUENO et al., 2003), tais como: encefalite multifocal não supurativa, necrose focal do miocárdio, miocardite não supurativa, com posterior identificação do agente por imunoistoquímica (DUBEY et al., 2006a; PESCADOR et al., 2007). Se o exame do soro materno, fluídos corporais fetais ou tecidos fetais for positivo para *N. caninum*, o aborto pode estar associado à neosporose, porém é importante relacionar outras causas potenciais e/ou a detecção direta do parasito em lesões cerebrais e cardíacas (DUBEY et al., 2006b). No entanto ensaios sorológicos são essenciais em levantamentos epidemiológicos. Dentre os testes que detectam anticorpos, a imunofluorescência indireta (IFI) é considerada o teste de referência (DUBEY et al., 1988).

Outros formatos de testes foram descritos para identificar anticorpos específicos, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA) (AHN et al., 2003; BYREN et al., 2012) e teste de aglutinação (*Neospora* Agglutination Test) (ROMAND et al., 1998). Porém, os ensaios de ELISA desenvolvidos apresentaram menor especificidade quando comparados a IFI, por se basearem na utilização de antígenos solúveis totais do parasito, incluindo antígenos intracelulares, enquanto a IFI utiliza taquizoítos fixados intactos, prevalecendo os antígenos de superfície do parasito (BJORKMAN et al., 1999).

Ensaos que utilizam antígenos espécie-específicos de *N. caninum* apresentam maior sensibilidade e especificidade quando comparados à técnica padrão (BORSUK et al., 2011; DONG et al., 2012; MORAVEJI et al., 2012; SELAHI et al., 2013). Anticorpos policlonais e monoclonais contra antígenos nativos específicos de *N. caninum* foram desenvolvidos com o objetivo de aperfeiçoar o

diagnóstico (LATIF et al., 2008; UCHIDA et al., 2013). Recentemente foi relatado um painel de anticorpos monoclonais (mAbs) contra proteínas nativas de *N. caninum*, onde os mAbs gerados reconheceram uma variedade de proteínas presentes em micronemas, roptrias, grânulos densos, mitocôndrias, apicoplasto, complexo membrana interna, e superfície do parasito (SOHN et al., 2011).

A obtenção da proteína nativa é laboriosa devido à necessidade de grande quantidade de taquizoítos obtidos através de cultivo celular, portanto antígenos recombinantes são uma alternativa importante, devido a possibilidade de produção em quantidades significativas, facilitando a geração de insumos e padronização de ensaios sorológicos (DUBEY et al., 2006b). Recentemente, um ELISA indireto para o diagnóstico da neosporose foi relatado utilizando a proteína recombinante Ncp-43 (BORSUK et al., 2011) e anticorpos policlonais monoespecíficos desenvolvidos contra este antígeno apresentaram potencial para detecção do parasito (DE SÁ et al., 2013).

2 Justificativa

Devido à utilização de lisados do parasito ou taquizoítos inteiros o diagnóstico da neosporose é considerado laborioso, demorado ou inespecífico. Portanto faz-se necessário o desenvolvimento de novos ensaios diagnósticos utilizando antígenos específicos e/ou insumos produzidos a partir destes antígenos, com a finalidade de melhorar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da neosporose.

3 Objetivo

Produzir e avaliar anticorpos policlonais (pAb) contra a proteína recombinante Ncp-43 de *N. caninum*, e análise de seu potencial para diagnóstico da neosporose.

3.1 Objetivos específicos

- Expressar e purificar a proteína Ncp-43 em *Escherichia coli*;
- Avaliar a reação de rNcp-43 com anticorpos presentes em soros de animais naturalmente infectados com *N. caninum*;
- Produzir anticorpos policlonais (pAbs) contra o antígeno de membrana Ncp-43;
- Avaliar a reação do pAb gerado com as proteínas recombinante e nativa através das técnicas de ELISA, *dot blot* e imunofluorescência;
- Conjugar o pAb produzido com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e peroxidase (HRP);
- Avaliar o potencial diagnóstico dos pAbs obtidos.

4 Artigo

POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rNcp-43 PARA DETECÇÃO DE *Neospora caninum*

(Formatado nas normas do periódico *Current Microbiology*)

(Manuscrito publicado em 2013)

**POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rNcp-43
PARA DETECÇÃO DE *Neospora caninum***

**Gizele Lima Sá^{1,Ψ}, Diene de Borba Pacheco^{1,Ψ}, Leonardo Garcia Monte¹,
Francine Alves Sinnott¹, Marina Amaral Xavier¹, Caroline Rizzi¹, Sibeles Borsuk²,
Maria Elisabeth Aires Berne³, Renato Andreotti⁴, Cláudia Pinho Hartleben^{1,*}**

¹Laboratório de Imunodiagnóstico e ²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia; Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

^Ψ Estes autores, contribuíram igualmente para o trabalho experimental.

* Endereço para correspondência (endereço postal): Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil - P.O. Box 354. Phone: + 55 (53) 32757350

E-mail: hartlebenclaudia@gmail.com

RESUMO

Neosporose é a doença causada pelo parasito apicomplexa *Neospora caninum*, o qual é intimamente relacionado a *Toxoplasma gondii*. A infecção por *N. caninum* representa uma importante causa de falha reprodutiva em ovinos, caprinos, equinos e bovinos ao redor do mundo. O diagnóstico da neosporose é baseado na detecção de anticorpos específicos contra o patógeno em soros, ou a presença de cistos teciduais em animais. No entanto, as semelhanças morfológicas e a possível reatividade sorológica cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* pode resultar no diagnóstico errôneo. Neste estudo, a proteína de superfície Ncp-43 de taquizoítos de *N. caninum*, foi expressa de forma recombinante em *Escherichia coli* e utilizada para produção de anticorpos policlonais (pAb). O pAb foi purificado e conjugado a peroxidase (HRP) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) para detectar as proteínas recombinantes e nativas Ncp-43, respectivamente. pAb e pAb/HRP foram capazes de reconhecer rNcp-43, o que foi avaliado pelas técnicas de *Dot blot* e ELISA enquanto pAb/FITC se mostrou eficiente na imunomarcação do complexo apical de taquizoítos. Um ensaio imunoenzimático de bloqueio (b-ELISA) foi realizado para avaliar a performance do pAb/HRP como ferramenta de diagnóstico. A porcentagem de inibição média para as amostras de pool de soros positivos e o pool de negativos de bovinos com neosporose foi significativamente diferente ($P < 0,0001$). Estes resultados sugerem que o pAb pode ligar-se aos mesmos epítomos da Ncp-43 que os anticorpos anti-*N. caninum* de amostras positivas testadas. O b-ELISA utilizando o pAb/HRP representa uma opção interessante aos testes de diagnóstico disponíveis para a neosporose, uma vez que menos passos estão envolvidos na sua realização e seu formato evita a reatividade cruzada com anticorpos anti-espécie específicos. Em resumo, este trabalho descreve a produção de anticorpos contra *N. caninum*, e avalia o potencial dessas ferramentas para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos para neosporose.

Palavras chaves: *Neospora caninum*, neosporose, ELISA, Ncp-43, diagnóstico.

COMUNICAÇÃO BREVE

Neosporose é uma doença causada pelo parasito apicomplexa *Neospora caninum*, o qual é morfologicamente relacionado a *Toxoplasma gondii* [10]. A infecção por *N. caninum* causa desordens neuromusculares em cães e falha reprodutiva em ovinos, caprinos, equinos e bovinos, resultando em perdas econômicas ao redor do mundo [22,11]. O diagnóstico da neosporose é normalmente baseado em exame histopatológico e imunohistoquímica para identificação do parasito em tecidos ou através da análise sorológica [3]. No entanto, a similaridade morfológica e a reatividade sorológica cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* pode resultar no diagnóstico errôneo da neosporose [20]. O teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi primeiramente aplicado para o diagnóstico de neosporose em cães, e tem sido largamente utilizado como um teste padrão para análise sorológica [9]. Nos últimos anos, têm sido propostos métodos alternativos para aprimorar o diagnóstico da neosporose, tais como o teste de aglutinação de *Neospora* [7], o teste de aglutinação em látex [19] e ensaio imunoenzimático (ELISA) [11,7,9,21]. Apesar da variedade de estratégias, a maioria destes ensaios baseia-se na análise de lisados de parasitos ou taquizoítos inteiros fixados, razão pela qual são considerados demorados e laboriosos [12]. Assim, os antígenos individuais, tais como as proteínas de superfície do parasito, fornecem uma alternativa interessante para a detecção de anticorpos específicos em hospedeiros infectados ou para a produção de anticorpos policlonais monoespecíficos que podem ser utilizados como ferramentas para o desenvolvimento de testes mais específicos [27]. Entre estas proteínas, o domínio do gene *NcSRS2* (proteína Ncp-43) tem sido avaliado como um importante antígeno de *N. caninum* para utilização em ensaios de diagnóstico [6]. Além disso, Ncp-43 é comum em ambas as fases de taquizoítos e bradizoítos, e foi capaz de detectar anticorpos específicos para o parasito no soro de bovinos [6, 23], ovinos [2], e caninos [4] naturalmente infectados. Este trabalho descreve a produção e avaliação de anticorpos policlonais (pAb) gerados contra a proteína recombinante Ncp-43 (rNcp-43), e análise de seu potencial para o diagnóstico da neosporose.

Para a produção da proteína recombinante, o domínio antigênico do gene *NcSRS2* (proteína rNcp-43), de dois terços da molécula, localizado na porção C-terminal, foi amplificado por PCR utilizando os primers F5'- CAC CAA AGA GTG GGT GAC TGG e R5'- AAG GGT CTT TGC ATC TCC TCT AAT CAC-3', clonado no vetor TOPO pET100/D (Invitrogen tech, Carlsbad, CA, EUA) e utilizado para

transformar *Escherichia coli* cepa BL21 Star. As células de *E. coli* na fase logarítmica (DO 600 nm = 0,6 - 0,8) foram tratadas com 0,75 - mM de isopropil- α -D-tiogalactósido (IPTG), durante 3 h a 37°C para indução da expressão de fragmentos fundidos do gene *NcSRS2*. A proteína foi solubilizada em tampão contendo 0.2% de N-lauroilsarcosine. A expressão da proteína rNcp-43 foi confirmada por SDS-PAGE a 10%, e *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina (Sigma-Aldrich, EUA). A rNcp-43 foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna Sepharose HisTrap carregada com íons N^{2+} metálicos imobilizados (IMAC), segundo instruções do fabricante (GE Healthcare, EUA). A rNcp-43 purificada foi dialisada em PBS (contendo 0,1% de glicina, pH 8,0) durante cerca de 16 h a 4°C. As frações de rNcp-43 purificadas foram analisadas por SDS-PAGE a 12% em condições redutoras, e as concentrações finais foram determinadas através do Kit BCA (Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, EUA) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Dois coelhos da raça Nova Zelândia de 6 meses de idade, após um período de adaptação de 30 dias, foram imunizados com rNcp-43. Para cada coelho, cinco imunizações subcutâneas foram administradas na área escapular, alternando entre os lados direito e esquerdo. A primeira dose de imunógenos continha 100 μ g de rNcp-43 e adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, EUA). As imunizações subsequentes foram realizadas nos dias 7, 14, 21, e 28 utilizando 100 μ g de rNcp-43 e adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, EUA). Foi realizada coleta sanguínea antes de cada imunização, para determinar os títulos de anticorpos. Após a última imunização, foi realizado ELISA indireto para determinar o título de anticorpos anti-rNcp-43. O soro hiperimune obtido a partir desses animais foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência da purificação foi avaliada por SDS-PAGE a 10%, e a concentração final foi determinada por espectrofotometria a 280nm. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com as orientações recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

A detecção de Ncp-43 em suas formas recombinante e nativa foi avaliada por ELISA, *Dot blot* e imunofluorescência direta e indireta (IF). Para os ensaios diretos, o pAb foi conjugado com horseradish peroxidase (pAb/HRP) ou isotiocianato de fluoresceína (pAb/FITC), de acordo com protocolos estabelecidos [15]. *ELISA*:

placas de poliestireno (Nunc Polysorp, Nalge Nunc International, Rochester, EUA) foram sensibilizadas com rNcp-43 (50ng/cavidade). As cavidades foram lavados e bloqueados com PBS contendo 5% de leite desnatado, e diluições seriadas (1:100 - 1:512,000) de pAb ou pAb/HRP foram adicionadas as cavidades, seguido de incubação de 1 h a 37°C. Em paralelo, as cavidades controles sensibilizados apenas com pAb foram tratados com o anticorpo anti-coelho conjugado com HRP (Sigma-Aldrich, EUA) durante 1 h a 37°C. Após repetidas lavagens com PBS, foi adicionada as cavidades solução substrato (0,4 mg/ml de o-fenilenodiamina contendo 0,03% de H₂O₂ em tampão citrato 0,1M, pH 4,0). O produto da reação colorimétrica foi detectado a uma absorbância de 450nm utilizando um leitor de placas VICTOR X5 Multilabel (PerkinElmer, EUA). *Dot blot*: membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, UK) foram sensibilizadas com rNcp-43 (50 ng/gota) e incubados a 37°C até secar. As membranas foram bloqueadas com PBS contendo 5% de leite desnatado, e incubadas com pAb (1:6.000) ou pAb/HRP (1:500) durante 1 h a 37°C. As membranas incubadas com pAb foram tratadas com o anticorpo anti-coelho conjugado a HRP durante 1 h a 37°C. Após três lavagens de 5 min com PBS-T (Tween 20 0,05%), foram incubadas em solução de substrato (6 mg de diaminobenzidina, 0,03% de H₂O₂, e sulfato de níquel a 0,03% em 50mM Tris-HCl, pH 8,0). O soro pré-imunizações e o soro hiperimune (após a última imunização) foram utilizados como controles. *IF*: o pAb e pAb/FITC foram avaliados com Ncp-43 utilizando taquizoítos de *N. caninum* das cepas Nc-1 [9], Nc-Goiás [13], e Nc-Liv [5], gentilmente cedidas pela Débora Pereira Garcia e Andrea Caetano da Silva (Universidade Federal de Goiás). As cepas foram propagadas em células VERO [9], e, quando 80% das células demonstraram efeito citopático (com base na integridade celular, geralmente 3 – 4 dias após infecção), consequência da multiplicação dos taquizoítos de *N. caninum*, a monocamada celular foi removida por raspagem, lavada duas vezes com PBS, e centrifugada a 1000 x g durante 10 min. As células foram fixadas em lâminas (ICN Biomedicals Inc., EUA) durante 1 h a 37°C. As lâminas foram bloqueadas com PBS contendo 10% de soro fetal bovino, lavadas duas vezes com PBS, e incubadas com pAb ou pAb/FITC durante 1 h a 37°C. As lâminas revestidas apenas com pAb foram tratadas com o anticorpo anti-coelho conjugado com FITC (Sigma-Aldrich, EUA) durante 1 h a 37°C. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas durante 1 h em câmara úmida, no escuro, a 37°C. Após lavagens com PBS, foi adicionado à lâmina o meio de montagem e a

imunomarcacão foi visualizada por microscopia de fluorescência (Olympus BX 51), com um comprimento de onda de excitação de 450 nm. Soro normal e células de *T. gondii* foram utilizados como controles negativos.

Para avaliar a aplicação de anticorpos anti-Ncp-43 (pAb e pAb/HRP) para o diagnóstico sorológico da neosporose, um ensaio imunoenzimático de bloqueio (b-ELISA) foi desenvolvido. Para isso, placas de poliestireno foram sensibilizadas e bloqueadas como descrito acima. Treze amostras positivas e onze negativas de soro bovino não diluídas (Laboratório de Parasitologia - Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil), previamente testados por IF para neosporose, foram adicionados às placas e incubadas por 1 h a 37°C. As cavidades foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com pAb (1:32,000) ou pAb/HRP (1:500) durante 1 h a 37°C. As cavidades incubadas apenas com pAb foram tratadas com o anticorpo anti-coelho conjugado com a peroxidase durante 1 h a 37°C. A mesma solução de substrato utilizada para o ELISA foi adicionada às cavidades para reação colorimétrica. As reações foram determinadas por adição de 2N H₂SO₄, e a densidade óptica (DO) medida a 492 nm em leitor de placas VICTOR X5 Multilabel. As concentrações dos reagentes utilizados nas várias etapas do ELISA (isto é, o anticorpo primário, pAb, ou pAb/HRP, e o antígeno para sensibilização) foram estabelecidas através da variação da concentração do reagente adicionado durante um determinado passo, enquanto se mantêm as condições para todas as outras etapas em uma constante, exceto para a etapa de reação colorimétrica. A porcentagem de inibição para cada diluição foi determinada comparando a média de cada uma das cavidades em duplicata com as médias das cavidades controles em duplicata, utilizando a seguinte fórmula: porcentagem de inibição = $[1 - (DO \text{ da amostra} - DO \text{ do tampão} / DO \text{ do controle negativo} - DO \text{ do tampão})] \times 100$ [26]. Esses experimentos foram realizados em triplicata. Todas as amostras foram previamente testadas por IFI de acordo com protocolos estabelecidos [24]. O teste *T Student's* foi utilizado para avaliar diferenças entre as médias.

Neste estudo, foram produzidos pAbs contra um antígeno imunodominante (Ncp-43) de *N. caninum*, purificados e seu potencial como uma ferramenta em ensaios para imunodiagnóstico de neosporose foi avaliado. A produção de anticorpos em coelhos é um processo rápido e barato, além disso, a utilização de anticorpos policlonais contra um epítipo imunodominante tem vantagens sobre a utilização de anticorpos contra antígenos inteiros, em termos de sensibilidade e

especificidade [15]. Além disso, pAbs são capazes de reconhecer epítomos diferentes do mesmo antígeno, o que aumenta a probabilidade de detecção [15]. Portanto, títulos elevados de anticorpos contra rNcp-43 foram detectados através de ELISA indireto nos soros hiperimunes dos coelhos (1:52,000), b-ELISA (pAb, 1:32,000; pAb/HRP, 1:500), e *Dot blot* (pAb, 1:6.000; pAB/HRP, 1:500), com uma atividade que persiste após conjugação HRP (Figura 1).

Os ensaios de ELISA direto e IFI foram realizados para investigar a interação entre o pAb e a Ncp-43 nativa na superfície do parasito. Tanto o pAb (dados não mostrados) quanto o pAb/FITC (Figura 2) foram capazes de marcar o complexo apical de taquizoítos, enquanto nenhuma imunorreatividade foi observada quando utilizadas células de *T. gondii* (Figura 2A) ou soro normal de coelho (dados não mostrados).

Tendo em vista que não há nenhuma terapia ou vacina eficaz para neosporose, há uma necessidade urgente de melhorar as estratégias para controle desta doença. Embora métodos sorológicos tenham sido desenvolvidos para esta finalidade [1,11,14,16], a maioria destes ensaios tem limitações, incluindo baixa especificidade e sensibilidade [8], e alguns requerem o preparo de lisado de parasitos [3] ou taquizoítos fixos [9], tornando a preparação de antígenos trabalhosa e os ensaios dispendiosos. b-ELISA é um método eficaz para a detecção de anticorpos específicos contra o patógeno, e tem sido amplamente utilizado para monitorar doenças infecciosas em animais [17,25,18]. Este ensaio é superior ao ELISA indireto, uma vez que não necessita de anticorpos secundários específicos para as imunoglobulinas da espécie a ser testada, e tem a vantagem adicional de que soro contendo IgM pode ser testado com confiabilidade utilizando um único ensaio [25].

Amostras de soro de animais infectados por *Neospora* foram utilizadas num ensaio b-ELISA, a fim de avaliar a capacidade destes anticorpos em bloquear o sítio de ligação de pAb anti-Ncp-43. A inibição percentual média diferiu significativamente entre as amostras positivas e negativas de soro testadas ($P < 0,0001$, Figura 3). Estes resultados sugerem que o pAb obtido neste estudo, pode ligar-se aos mesmos epítomos de Ncp-43 de anti-*N. caninum* que anticorpos das espécies testadas. O b-ELISA utilizando um pAb HRP-conjugado representa uma opção interessante aos testes de diagnóstico disponíveis para neosporose, uma vez que menos passos estão envolvidos na sua realização e seu formato evita reatividade cruzada com

anticorpos secundários. Em conclusão, o anti-rNcp-43 pAb pode ser útil no desenvolvimento de diferentes tipos de testes para o diagnóstico da neosporose em animais.

Agradecimentos

O financiamento para este estudo foi fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Grant AUX-PE-PNPD-1513/2008) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflitos de interesses

Não existem interesses financeiros concorrentes.

Referências

1. Ahn HJ, Kim S, Kim DY et al (2003) ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Ncp-43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. Korean J Parasitol 41:175-177
2. Andreotti R, Matos MF, Goncalves KN et al (2009) Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. Rev Bras Parasitol Vet 18:19-22
3. Atkinson RA, Cook RW, Reddacliff LA et al (2000) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. Aust Vet J 78:262-266
4. Bandini LA, Neto AF, Pena HF et al (2011) Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. Vet Parasitol 176:151-156
5. Barber JS, Holmdahl OJ, Owen MR et al (1995) Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). Parasitol 111:563-568
6. Borsuk S, Andreotti R, Leite FP et al (2011) Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. Vet Parasitol 177:33-38
7. Canada N, Meireles CS, Carvalheira J et al (2004) Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle. Vet Parasitol 121:225-231
8. Dong JH, Otsuki T, Kato T et al (2013) Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of *N. caninum*. PLoS One 8:e53264
9. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS et al (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J Am Vet Med Assoc 193:1259-1263
10. Dubey JP, Lindsay DS (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol 67:1-59
11. Dubey JP, Schares G (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol 140:1-34
12. Dubey JP, Schares G (2011) Neosporosis in animals - the last five years. Vet Parasitol 180:90-108

13. García-Melo DP, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM et al (2009) Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. *Acta Parasitol* 54:180-185
14. Gaturaga I, Chahan B, Xuan X et al (2005) Detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with truncated NcSRS2 expressed in *Escherichia coli*. *J Parasitol* 91:191-192
15. Harlow E., Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Hemphill A, Fuchs N, Sonda S et al (1999) The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 29:1175-1188
17. Kit S, Otsuka H, Kit M (1992) Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine. *J Virol Methods* 40:45-56
18. Li X, Li G, Teng Q et al (2012) Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against newly emerged duck Tembusu virus. *PLoS One* 7:e53026
19. Moraveji M, Hosseini A, Moghaddar N et al (2012) Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Parasitol* 189:211-217
20. Mugridge NB, Morrison DA, Heckerroth AR et al (1999) Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 29:1545-1556
21. Pare J, Hietala SK, Thurmond MC (1995) An Enzyme-linked-immunosorbent-assay (Elisa) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in Cattle. *J Vet Diagn Invest* 7:352-359
22. Piagentini M, Moya-Araujo CF, Prestes NC et al (2012) *Neospora caninum* infection dynamics in dairy cattle. *Parasitol Res* 111:717-721
23. Pinheiro AM, Costa MF, Paule B et al (2005) Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet Parasitol* 130:73-79
24. Pitel PH, Pronost S, Chatagnon G et al (2001) Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Vet Parasitol* 102:269-277

25. Shearer PL, Sharp M, Bonne N et al (2009) A blocking ELISA for the detection of antibodies to psittacine beak and feather disease virus (BFDV). J Virol Methods 158:136-140
26. Teixeira MFB, Esteves PA, Schmidt CS et al (2001) ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Pesq Vet Brasil 21:33-37
27. Zhang H, Lee EG, Yu L et al (2011) Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neosporacanthium* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. Parasitol Res 109:899-911.

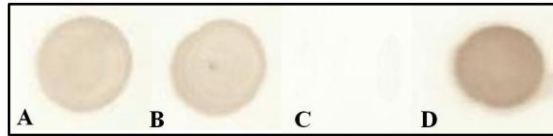


Fig. 1 Ensaio de *Dot blot* utilizando pAb ou pAb conjugado a HRP para detecção de rNcp-43 imobilizada em membrana de nitrocelulose. **A** pAb (1:6.000). **B** pAb/HRP (1:500). **C** Controle negativo (*pool* de soros antes das imunizações). **D** Controle positivo (*pool* de soros hiperimunes).

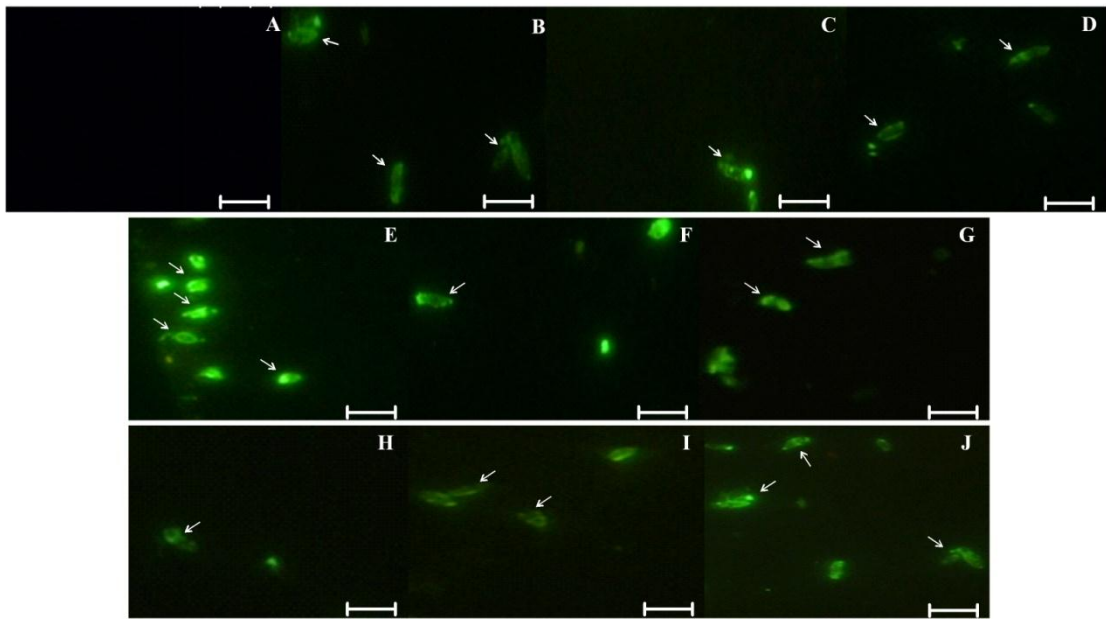


Fig. 2 Detecção do complexo apical de taquizoítos de *N. caninum* por imunofluorescência direta. Os taquizoítos foram fixados em lâminas de microscopia e tratadas com pAb contra rNcp-43 conjugado a FITC(setas). **A** Células de *T. gondii* foram utilizadas como antígenos para controle negativo. **B - D** Cepa Nc-1. **E - G** Cepa Nc-Goiás. **H - J** Cepa Nc-Liv. A visualização foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com objetiva de 100x. Escala 10 μ m.

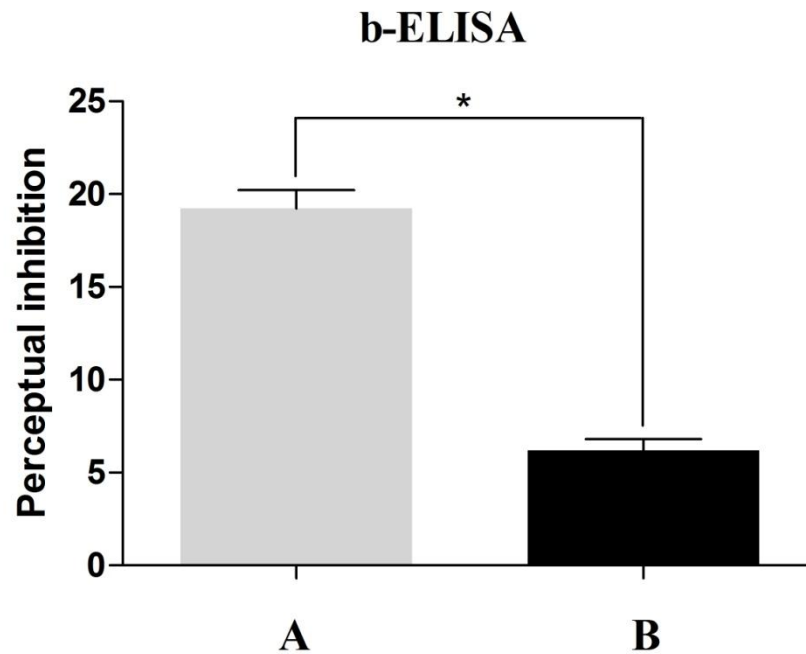


Fig. 3 ELISA de bloqueio utilizando pAb/HRP para detecção de anticorpos em soros de animais infectados por *N. caninum*. *Pool* de amostras positivas (a) e negativas (b) de bovinos foram utilizadas como fontes de anticorpos bloqueadores. As diferenças entre médias foram estatisticamente significativas (* $P \leq 0,0001$)

5 Conclusões

- A proteína rNcp-43 é capaz de gerar um anticorpo policlonal monoespecífico que reconhece a proteína nativa em taquizoítos, e sugere que este anticorpo pode ligar-se aos mesmos epítomos presentes no parasito *N. caninum*.
- É possível a utilização deste anticorpo, quando conjugado a FITC, em ensaios de detecção direta e específica do parasito.
- O b-ELISA utilizando o pAb/HRP representa uma opção interessante aos testes de diagnóstico disponíveis para a neosporose, uma vez que menos passos estão envolvidos na sua realização e seu formato evita a reatividade cruzada com anticorpos anti-espécie específicos.

REFERÊNCIAS

- AHN, H. J.; KIM, S.; KIM, D. Y.; NAM, H. W. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Ncp-43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. **Korean Journal Parasitology**, v.41, n.3, p.175-177, 2003.
- AL-QASSAB, S.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. **Molecular and Cellular Probes**, v.24, n.1, p.20-26, 2010.
- ALMERIA, S.; SERRANO, B.; YANIZ, J. L.; DARWICH, L.; LOPEZ-GATIUS, F. Cytokine gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation. **Veterinary Parasitology**, v.183, n.3-4, p.237-243, 2012.
- ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; PEREIRA, A. R.; OSHIRO, L. M.; CUNHA, R. C.; FIGUEIREDO NETO, L. F. Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v.19, n.2, p.119-123, 2010.
- BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.1, p.57-64, 1998.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A. E.; DUBEY, J. P.; ARDANS, A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.1, p.113-117, 1993.
- BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; DOS SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H.; DA COSTA, A. J.; MINEO, J. R.; LOBATO, J.; DE OLIVEIRA SILVA, D. A.; GENNARI, S. M. Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18 Suppl 1, p.29-33, 2009.
- BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.70, n.2, p.271-274, 1984.
- BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.10, p.1497-1507, 1999.
- 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.

BOYSEN, P.; KLEVAR, S.; OLSEN, I.; STORSET, A. K. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. **Infection and Immunity**, v.74, n.2, p.953-960, 2006.

BYREN, I.; REGE, S.; CAMPANARO, E.; YANKELEV, S.; ANASTASIOU, D.; KUROPATKIN, G.; EVANS, R. Randomized controlled trial of the safety and efficacy of Daptomycin versus standard-of-care therapy for management of patients with osteomyelitis associated with prosthetic devices undergoing two-stage revision arthroplasty. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.11, p.5626-5632, 2012.

CARDOSO, J. M.; AMAKU, M.; ARAUJO, A. J.; GENNARI, S. M. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on three dairy farms in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.187, n.3-4, p.553-557, 2012.

CORBELLINI, L. G.; SMITH, D. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D. J.; DRIEMEIER, D. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, n.2-3, p.130-141, 2006.

DA CUNHA FILHO, N. A.; LUCAS, A. S.; PAPPEN, F. G.; RAGOZO, A. M.; GENNARI, S. M.; JUNIOR, T. L.; FARIAS, N. A. Risk factors and prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in urban and rural dogs from Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17 Suppl 1, p.301-306, 2008.

DAVISON, H. C.; GUY, C. S.; MCGARRY, J. W.; GUY, F.; WILLIAMS, D. J.; KELLY, D. F.; TREES, A. J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v.70, n.2, p.163-168, 2001.

DE SA, G. L.; PACHECO, D. DE B.; P. D.; MONTE, L. G.; SINNOTT, F. A.; XAVIER, M. A.; RIZZI, C.; BORSUK, S.; BERNE, M. E.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C. P. Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*. **Current Microbiology** 2013.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; BEIBOER, M. L.; WOUDA, W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v.110, n.3-4, p.161-169, 2003.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H. W.; EYSKER, M.; HESSELINK, J. W.; WOUDA, W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.2, p.99-104, 2002.

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

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitol.**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, n.4, p.267-289, 2006a.

DUBEY, J. P.; DOROUGH, K. R.; JENKINS, M. C.; LIDDELL, S.; SPEER, C. A.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **Journal of Comparative Pathology**, v.28, n.8, p.1293-1304, 1998.

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. **American Veterinary Medical Association**, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.

DUBEY, J. P.; JENKINS, M. C.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.181, n.2-4, p.382-387, 2011a.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.1-2, p.1-34, 2006b.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.90-108, 2011b.

ELLIS, J.; SINCLAIR, D.; MORRISON, D.; AL-QASSAB, S.; SPRINGETT, K.; IVENS, A. Microarray analyses of mouse responses to infection by *Neospora caninum* identifies disease associated cellular pathways in the host response. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.174, n.2, p.117-127, 2010.

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMPLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.2, p.159-161, 2004.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v.13, p.133-150, 2013.

HASLER, B.; STARK, K.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Epidemiological and financial considerations for the control of *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. **Schweiz Arch Tierheikd**, v.150, n.6, p.273-280, 2008.

HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v.43, p.47-104, 1999.

HOWE, D. K.; CRAWFORD, A. C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L. D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.66, n.11, p.5322-5328, 1998.

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v.18, n.11, p.497-504, 2002.

JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **Journal Parasitology**, 34, 285 - 296, 2004.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; FONSEKA, S.; KASPER, L. H. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, v.85, n.1, p.24-34, 1997.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.40, n.8, p.945-950, 2010.

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, n.3, p.225-231, 2008.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C.: Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme, **Int. Journal Parasitology**, v. 31, 1285 – 1292, 2001.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Determination of the activity of diclazuril against *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula* in cell cultures. **Journal Parasitology**, v.86, n.1, p.164-166, 2000.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V. T.; RICHARTZ, R. R.; GASINO-JOINEAU, M. E.; VINNE, R.; PINCKNEY, R. D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **Journal Parasitology**, v.87, n.6, p.1493-1494, 2001.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v.18, n.5, p.198-201, 2002.

MCALLISTER, M. M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D. G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, n.6, p.881-887, 2000.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.

MELO, D. P.; DA SILVA, A. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BASTOS, S. A.; BOAVENTURA, C. M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in bovines from Anapolis and Goiania microregions, Goias, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.105-109, 2006.

MILLER, C. M.; QUINN, H. E.; WINDSOR, P. A.; ELLIS, J. T. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.80, n.10, p.620-625, 2002.

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, n.2-4, p.211-217, 2012.

MOURA, A. B.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; PISETTA, G. M.; TEIXEIRA, E. B.; HEUSSER JUNIOR, A. Neospora caninum antibodies and risk factors in dogs from Lages and Balneário Camboriú, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.262-265, 2011.

MUNHOZ, A. D.; FLAUSINO, W.; SILVA, R. T.; ALMEIDA, C. R.; LOPES, C. W. Distribution of anti-Neospora caninum antibodies in dairy cows at municipalities of Resende and Rio Claro in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.101-104, 2006.

NISHIKAWA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; MAKALA, L.; XUAN, X.; NAGASAWA, H. Neospora caninum NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.3-4, p.191-201, 2002.

OROZCO, M. A.; MORALES, E.; SALMERON, F. Characterization of the inflammatory response in the uteri of cows infected naturally by Neospora caninum. **Journal of Comparative Pathology**, v.148, n.2-3, p.148-156, 2013.

PENA, H. F.; SOARES, R. M.; RAGOZO, A. M.; MONTEIRO, R. M.; YAI, L. E.; NISHI, S. M.; GENNARI, S. M. Isolation and molecular detection of Neospora caninum from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, p.61-66, 2007.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREZ-PEREZ, V.; ESPIFELGUEROSO, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with Neospora caninum in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2-3, p.143-152, 2003.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Histopathological and immunohistochemical aspects of Neospora caninum diagnosis in bovine aborted fetuses. **Veterinary Parasitology**, v.150, n.1-2, p.159-163, 2007.

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A. R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for Neospora caninum tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v.31, n.10, p.1144-1148, 2001.

PIAGENTINI, M.; MOYA-ARAUJO, C. F.; PRESTES, N. C.; SARTOR, I. F. Neospora caninum infection dynamics in dairy cattle. **Parasitology Research**, v.111, n.2, p.717-721, 2012.

RAGOZO A.M.A.; PAULA V.S.O.; SOUZA S.L.P.; BERGAMASCHI D.P.; ENNARI S.M. Ocorrência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.1, p.33-37, 2003.

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, L. F.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle - the

billion dollar question. **International Journal Parasitology**, v.43, n.2, p.133-142, 2013.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, n.6, p.308-312, 2007.

RODRIGUES, A. A.; GENNARI, S. M.; AGUIAR, D. M.; SREEKUMAR, C.; HILL, D. E.; MISKA, K. B.; VIANNA, M. C.; DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, n.3-4, p.139-150, 2004.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v.84, n.1, p.50-53, 1998.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGE, L.; GOTTSTEIN, B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v.102, n.1-2, p.1-15, 2001.

SELAHI, F.; NAMAVARI, M.; HOSSEINI, M. H.; MANSOURIAN, M.; TAHAMTAN, Y. Development of a disperse dye immunoassay technique for detection of antibodies against *Neospora caninum* in cattle. **Korean Journal Parasitology**, v.51, n.1, p.129-132, 2013.

SENGUPTA, P. P.; BALUMAHENDIRAN, M.; RAGHAVENDRA, A. G.; HONNAPPA, T. G.; GAJENDRAGAD, M. R.; PRABHUDAS, K. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle and water buffaloes and associated abortions in the plateau of Southern Peninsular India. **Tropical Animal Health and Production**, v.45, n.1, p.205-210, 2012.

SHARMA, S.; BAL, M. S.; MEENAKSHI; KAUR, K.; SANDHU, K. S.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs in India. **Journal Parasitology**, v.94, n.1, p.303-304, 2008.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Veterinary Pathology**, v.36, n.4, p.321-327, 1999.

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. **Public Library of Science**, v.6, n.4, p.e18383, 2011.

STASKA, L. M.; MCGUIRE, T. C.; DAVIES, C. J.; LEWIN, H. A.; BASZLER, T. V. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v.71, n.6, p.3272-3279, 2003.

UCHIDA, M.; NAGASHIMA, K.; AKATSUKA, Y.; MURAKAMI, T.; ITO, A.; IMAI, S.; IKE, K. Comparative study of protective activities of *Neospora caninum* bradyzoite

antigens, NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4, in a mouse model of acute parasitic infection. **Parasitology Research**, v.112, n.2, p.655-663, 2013.

VIANNA, M. C.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Veterinary Parasitology**, v.129, n.3-4, p.253-257, 2005.

WESTON, J. F.; HEUER, C.; WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.103, n.2-3, p.136-144, 2012.

WILLIAMS, D. J.; HARTLEY, C. S.; BJORKMAN, C.; TREES, A. J. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v.136, n.14, p.1895-1900, 2009.

WILLIAMS, D. J.; TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. **Parasite Immunology**, v.28, n.3, p.61-67, 2006.

ANEXO

Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*

Gizele Lima de Sá · Diene de Borba Pacheco · Leonardo Garcia Monte ·
Francine Alves Sinnott · Marina Amaral Xavier · Caroline Rizzi ·
Sibele Borsuk · Maria Elisabeth Aires Berne · Renato Andreotti ·
Cláudia Pinho Hartleben

Received: 15 September 2013 / Accepted: 16 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Neosporosis is a disease caused by the apicomplexan parasite *Neospora caninum*, which is closely related to *Toxoplasma gondii*. *N. caninum* infection represents an important cause of reproductive failure in sheep, goats, horses, and cattle worldwide. The diagnosis of neosporosis is based on the detection of pathogen-specific antibodies in animal sera or the presence of tissue cysts. However, morphological similarities and serological cross-reactivity between *N. caninum* and *T. gondii* can result in the misdiagnosis. In this study, the *N. caninum* tachyzoite surface protein Ncp-43 was expressed in a recombinant form to elicit polyclonal antibodies (pAb) response. The pAb was purified and conjugated to horseradish peroxidase

(HRP) or fluorescein isothiocyanate (FITC) to detect the recombinant and native Ncp-43 proteins, respectively. The pAb and pAb/HRP were able to recognize rNcp-43 by dot blot and ELISA, and pAb/FITC immunolabeled the apical complex of tachyzoites. A blocking enzyme-linked immunosorbent assay (b-ELISA) was performed to evaluate pAb/HRP as a diagnostic tool. The mean percent inhibition for the positive and negative serum samples from cattle with neosporosis was significantly different ($P < 0.0001$). These results suggest that the pAb may bind to the same epitopes of Ncp-43 as anti-*N. caninum* antibodies in the positive samples tested. The b-ELISA using the pAb/HRP can facilitate diagnostic testing for neosporosis, since fewer steps are involved, and cross-reactivity with secondary antibodies is avoided. In summary, this report describes the production of antibodies against *N. caninum*, and evaluates the potential of these tools for the development of new diagnostic tests for neosporosis.

Gizele Lima de Sá and Diene de Borba Pacheco contributed equally to the experimental work.

G. L. de Sá · D. de Borba Pacheco · L. G. Monte ·
F. A. Sinnott · M. A. Xavier · C. Rizzi · C. P. Hartleben (✉)
Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia,
Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal
de Pelotas, P.O. Box 354, Pelotas,
Rio Grande do Sul CEP 96010-900, Brazil
e-mail: hartlebenclaudia@gmail.com

S. Borsuk
Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de
Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul,
Brazil

M. E. A. Berne
Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de
Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande
do Sul, Brazil

R. Andreotti
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA),
Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Short Communication

Neosporosis is a disease caused by the apicomplexan parasite *Neospora caninum*, which is closely related to *Toxoplasma gondii* [10]. Infection by *N. caninum* causes neuromuscular disorders in dogs and reproductive failure in sheep, goats, horses, and cattle, resulting in economic losses worldwide [11, 22]. The diagnosis of neosporosis is usually based on histopathological and immunohistochemical tests that identify the parasite in tissues or through serological analysis [3]. However, morphological similarities and serological cross-reactivity between *N. caninum* and *T. gondii* can result in the misdiagnosis of neosporosis [20]. The indirect fluorescent-antibody test (IFAT) was first applied to the diagnosis of neosporosis in

[9] and has since been widely used as a standard test for serological analysis [9]. In recent years, alternative methods such as the *Neospora* agglutination test [7], the latex agglutination test [19], and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [7, 9, 11, 21] have been proposed to improve the diagnosis of neosporosis. Despite the variety of strategies, most of these tests are based on the analysis of whole parasite lysates or fixed tachyzoites and are, therefore, considered time-consuming and laborious [12]. Thus, single antigens such as parasite surface proteins provide an alternative for the detection of specific antibodies in infected hosts or for the generation of mono-specific polyclonal antibodies that can be useful tools for the development of more specific tests [27]. Among these proteins, the antigenic domain of the *NcSRS2* gene (Ncp-43 protein) has been reported as an important antigen from *N. caninum* for use in diagnostic assays [6]. In addition, Ncp-43 is common to both the tachyzoite and bradyzoite stages and was able to elicit parasite-specific antibodies in the serum of cattle [6, 23], sheep [2], and dogs [4]. This report describes the production and evaluation of polyclonal antibodies (pAb) generated against the recombinant Ncp-43 protein (rNcp-43) and examines its potential for the diagnosis of neosporosis.

For recombinant protein production, the antigenic domain of *NcSRS2* gene (rNcp-43 protein), located in the distal C-terminal two-thirds of the molecule, was amplified by PCR using primers F: 5'-CAC CAA AGA GTG GGT GAC TGG and R: 5'-GGT AAG CTT TGC ATC TCC TCT TAA CAC-3', cloned into pET100/D TOPO vector (Invitrogen Tech, Carlsbad, CA, USA) and used to transform *Escherichia coli* BL21 Star. The *E. coli* cells in the log phase ($OD_{600\text{ nm}} = 0.6\text{--}0.8$) were treated with 0.75 mM isopropyl α -D-thiogalactoside for 3 h at 37 °C to induce expression of fused fragments of *NcSRS2* gene. The protein was solubilized in a buffer containing 0.2 % *N*-Lauroylsarcosine. rNcp-43 expression was confirmed by 10 % SDS-PAGE and western blot using an anti-6 \times histidine antibody (Sigma-Aldrich, USA). rNcp-43 was purified by immobilized metal ion affinity chromatography using Ni^{2+} Sepharose HiTrap columns, following the manufacturer's instructions (GE Healthcare, USA). Purified rNcp-43 was dialyzed against PBS (containing 0.1 % glycine; pH 8.0) for approximately 16 h at 4 °C. Fractions of purified rNcp-43 were analyzed by 12 % SDS-PAGE in reducing conditions, and final concentrations were determined using bicinchoninic acid Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) with bovine serum albumin as a standard.

Two 6-month-old male New Zealand rabbits were immunized with rNcp-43 following a 30-day adaptation period. For each rabbit, five subcutaneous injections were administered in the scapular area, alternating between the

right and left sides. The first immunization dose contained 100 μ g rNcp-43 and complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA). Subsequent immunizations were performed after 7, 14, 21, and 28 days using 100 μ g rNcp-43 and incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA). Blood was collected prior to each immunization to determine antibody titers. After the last immunization, indirect ELISA was used to determine the rNcp-43 antibody titer. Hyperimmune serum was obtained from animals and purified by affinity chromatography using a protein A-Sepharose CL-4B column (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's instructions. Purification efficiency was evaluated by 10 % SDS-PAGE, and the final concentration was determined by spectrophotometry at 280 nm. The animals used in this study were treated in accordance with the guidelines recommended by Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

The detection of Ncp-43 in its recombinant and native forms was evaluated by ELISA, dot blot, and direct and indirect immunofluorescence (IF). For direct assays, the pAb was conjugated to horseradish peroxidase (pAb/HRP) or fluorescein isothiocyanate (pAb/FITC) according to established procedures [15]. ELISA: Polystyrene ELISA microtiter plates (Nunc Polysorp; Nalge Nunc International, Rochester, USA) were coated with rNcp-43 (50 ng/well). The wells were washed and blocked with 5 % nonfat milk in PBS, and serial dilutions (1:100–1:512,000) of pAb or pAb/HRP were added to the wells for 1 h at 37 °C. In parallel, control wells coated with pAb only were treated with HRP-conjugated anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich, USA) for 1 h at 37 °C. After repeated PBS washes, substrate solution (0.4 mg/mL o-phenylenediamine and 0.03 % H_2O_2 in 0.1 M citrate buffer, pH 4.0) was added to the wells. The colorimetric reaction product was detected at an absorbance of 450 nm using a VICTOR X5 Multi-label Plate Reader (PerkinElmer, USA). Dot blot: Nitrocellulose membranes (GE Healthcare, UK) were coated with rNcp-43 (50 ng/spot) and incubated at 37 °C until dry. The membranes were blocked with 5 % nonfat milk in PBS, and incubated with pAb (1:6,000) or pAb/HRP (1:500) for 1 h at 37 °C. The membranes probed with pAb only were treated with HRP-conjugated anti-rabbit antibody for 1 h at 37 °C. After three 5-min washes with PBST (0.05 % Tween 20), the membranes were incubated in substrate solution (6 mg diaminobenzidine, 0.03 % H_2O_2 , and 0.03 % nickel sulfate in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Preimmune and hyperimmune (after the last immunization) sera were used as controls. IF: The pAb and pAb/FITC were evaluated with Ncp-43 from *N. caninum* tachyzoites of strains Nc-1 [9], Nc-Goiás [13], and Nc-Liv [5], which were gifts from Débora Pereira Garcia and Andrea Caetano da Silva (Federal University of Goiás). The strains were propagated in Vero cells [9], and when 80 % of cells



Fig. 1 Dot blot assay with the pAb or HRP-conjugated pAb, using rNcp-43 protein immobilized on nitrocellulose membrane. **a** pAb (1:5,000). **b** pAb/HRP (1:500). **c** Negative control (pooled preimmune serum). **d** Positive control (pooled hyperimmune serum)

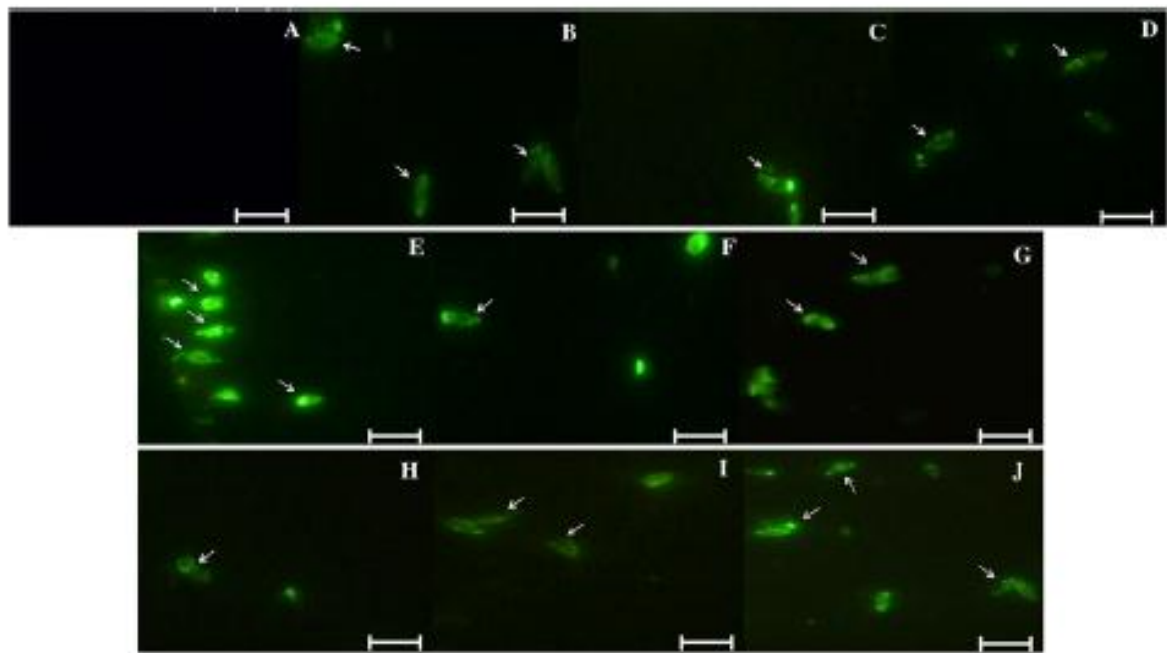


Fig. 2 Detection of the apical complex of tachyzoites of *N. caninum* by direct immunofluorescence. Tachyzoites were fixed on microscope slides and probed with the FITC-conjugated pAb against rNcp-43 (arrows). **a** *T. gondii* cells were used as a negative control for antigen

detection. **b–d** Strain No-1. **e–g** Strain No-Goiás. **h–j** Strain No-Liv. Visualization was performed using a 100× objective on an Olympus BX51 fluorescence microscope. Scale bars 10 µm

infected with *N. caninum* tachyzoites showed cytopathic effects (based on cell integrity, typically 3–4 days p.i.), the cell monolayer was removed by scraping, washed twice with PBS, and then centrifuged at 1,000×g for 10 min. The cells were loaded onto chamber slides (ICN Biomedicals Inc., USA) for 1 h at 37 °C. The slides were blocked with 10 % fetal bovine serum in PBS, washed twice with PBS, and coated with pAb or pAb/FITC for 1 h at 37 °C. The slides coated with pAb only were treated with the FITC-conjugated anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich, USA) for 1 h at 37 °C. The slides were washed twice with PBS and incubated for 1 h in a dark humid chamber at 37 °C. After PBS washes, a drop of mounting medium was added to the slide, and immunolabeling was visualized by fluorescence

microscopy (Olympus BX51) with an excitation wavelength of 450 nm. Preimmune sera and *T. gondii* cells were used as negative controls.

To investigate the utility of the anti-Ncp-43 antibodies (pAb and pAb/HRP) for the serological diagnosis of neosporosis, a blocking enzyme-linked immunosorbent assay (b-ELISA) was performed. For this, polystyrene ELISA microtiter plates were sensitized and blocked as described above. Thirteen positive and eleven negative undiluted serum samples (Laboratory of Parasitology/Federal University of Pelotas, RS, Brazil) from cattle previously tested by IF for neosporosis were added to the plates, which were incubated for 1 h at 37 °C. The wells were washed three times with PBS and incubated with pAb (1:32,000) or pAb/

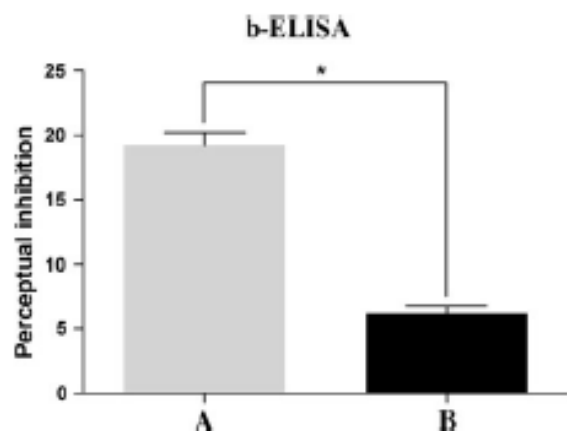


Fig. 3 Blocking ELISA using pAb/HRP as a diagnostic tool to detect antibodies in the serum of animals infected with *N. caninum*. Pools of positive (a) and negative (b) serum samples from cattle were used as sources of blocking antibodies. Mean differences were statistically significant (* $P < 0.0001$)

HRP (1:500) for 1 h at 37 °C. The wells coated with pAb only were treated with the HRP-conjugated anti-rabbit antibody for 1 h at 37 °C. The same substrate solution that was used for ELISA was added to the wells for the colorimetric reaction. The reactions were terminated by adding 2 N H₂SO₄, and the optical density (OD) was measured at 492 nm using the VICTOR X5 Multilabel Plate Reader. The concentrations for the reagents used in the various steps of the ELISA procedures (i.e., primary antibody, pAb, or pAb/HRP, and the coating antigen) were established by varying the concentration of the reagent added during a particular step, while maintaining the conditions for all the other steps at a constant, except for the colorimetric reaction step. The percent inhibition for each dilution was determined by comparing the mean of each of the duplicate wells to the mean of duplicate control wells using the following formula: percent inhibition = $[1 - (\text{OD of sample} - \text{OD of buffer/OD of negative control} - \text{OD of buffer})] \times 100$ [26]. These experiments were performed in triplicate. All clinical samples were previously tested by IFAT according to established methods [24]. The Student's *t* test was used to evaluate mean differences.

In this study, pAb against a single antigen (Ncp-43) from *N. caninum* was produced, purified, and evaluated for its potential as a tool in neosporosis immunodiagnostic assays. The generation of antibodies using rabbits is a rapid and inexpensive process, while the use of polyclonal antibodies against an immunodominant epitope has advantages over the use of antibodies to whole antigens in terms of sensitivity and specificity [15]. In addition, pAbs are able to recognize different epitopes on the same antigen, which increases the chances of detection [15]. Accordingly, high titers of antibodies against rNcp-43 were

detected by indirect ELISA testing of rabbit hyperimmune sera (1:52,000), b-ELISA (pAb, 1:32,000; pAb/HRP, 1:500), and dot blot assay (pAb, 1:6,000; pAb/HRP, 1:500), with activity persisting after HRP conjugation (Fig. 1).

Direct and indirect IF assays were performed to investigate the interaction of the pAb with native Ncp-43 on the parasite surface. Both the pAb (data not shown) and pAb/FTIC (Fig. 2) labeled the apical complex of tachyzoites, while no immunoreactivity was observed when *T. gondii* cells (Fig. 2a) or preimmune sera (data not shown) were used.

Since no therapy or effective vaccine is currently available for neosporosis, there is an urgent need to improve strategies to control this disease. Although serological methods have been developed for this purpose [1, 11, 14, 16], most of these assays have limitations including low specificity and sensitivity [8], and some require the preparation of whole parasite lysate [3] or fixed tachyzoites [9], making antigen preparation laborious and the assays costly. b-ELISA is an effective method for pathogen-specific antibody detection and has been widely used to monitor infectious diseases in animals [17, 18, 25]. This assay is superior to indirect ELISA as it does not require secondary antibodies specific to the immunoglobulins of the species being tested and has the added advantage that serum containing IgM can be reliably tested using a single assay [25].

Serum samples from *Neospora*-infected animals were used in a b-ELISA assay in order to evaluate the ability of these antibodies to block the binding site of anti-Ncp-43 pAb. The mean percent inhibition differed significantly between the positive and negative serum samples tested ($P < 0.0001$; Fig. 3). These results suggest that the pAb obtained in this study may bind to the same epitopes of Ncp-43 as anti-*N. caninum* antibodies from the species tested. The b-ELISA using an HRP-conjugated pAb can facilitate the performance of diagnostic tests, since fewer steps are involved, and cross-reactivity with secondary antibodies is avoided. In conclusion, the anti-rNcp-43 pAb may be useful in the development of different kinds of tests for the diagnosis of neosporosis in livestock.

Acknowledgments Funding for this study was provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Grant AUX-PE-PNP-1513/2008) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest No competing financial interests exist.

References

1. Ahn HJ, Kim S, Kim DY et al (2003) ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (No-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean J Parasitol* 41:175–177

2. Andreotti R, Matos MF, Gonçalves KN et al (2009) Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. *Rev Bras Parasitol Vet* 18:19–22
3. Atkinson RA, Cook RW, Reddacliff LA et al (2000) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust Vet J* 78:262–266
4. Bandini LA, Neto AF, Pena HP et al (2011) Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 176:151–156
5. Barber JS, Holmdahl OJ, Owen MR et al (1995) Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology* 111:563–568
6. Borsak S, Andreotti R, Leite FP et al (2011) Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Vet Parasitol* 177:33–38
7. Canada N, Meireles CS, Carvalheira J et al (2004) Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle. *Vet Parasitol* 121:225–231
8. Dong JH, Otsuki T, Kato T et al (2013) Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of *N. caninum*. *PLoS One* 8:e53264
9. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS et al (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 193:1259–1263
10. Dubey JP, Lindsay DS (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67:1–59
11. Dubey JP, Schares G (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 140:1–34
12. Dubey JP, Schares G (2011) Neosporosis in animals—the last five years. *Vet Parasitol* 180:90–108
13. García-Melo DP, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mom LM et al (2009) Isolation and biological characterisation of a new isolate of *Neospora caninum* from an asymptomatic calf in Brazil. *Acta Parasitol* 54:180–185
14. Gatranga I, Chahan B, Xuan X et al (2005) Detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with truncated NcSRS2 expressed in *Escherichia coli*. *J Parasitol* 91:191–192
15. Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: a laboratory manual cold spring*. Harbor Laboratory Press, New York
16. Hemphill A, Fuchs N, Sonda S et al (1999) The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 29:1175–1188
17. Kit S, Otsuka H, Kit M (1992) Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine. *J Virol Methods* 40:45–56
18. Li X, Li G, Teng Q et al (2012) Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against newly emerged duck Tembusu virus. *PLoS One* 7:e53026
19. Moraveji M, Hosseini A, Moghaddar N et al (2012) Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Parasitol* 189:211–217
20. Mugridge NB, Morrison DA, Heckeroth AR et al (1999) Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 29:1545–1556
21. Pare J, Hietala SK, Thumond MC (1995) An Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in Cattle. *J Vet Diagn Invest* 7:352–359
22. Piagentini M, Moya-Araujo CP, Prestes NC et al (2012) *Neospora caninum* infection dynamics in dairy cattle. *Parasitol Res* 111:717–721
23. Pinheiro AM, Costa MF, Paule B et al (2005) Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet Parasitol* 130:73–79
24. Pitel PH, Pronost S, Chatagnon G et al (2001) Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Vet Parasitol* 102:269–277
25. Shearer PL, Sharp M, Bonne N et al (2009) A blocking ELISA for the detection of antibodies to psittacine beak and feather disease virus (BFDV). *J Virol Methods* 158:136–140
26. Teixeira MPB, Esteves PA, Schmidt CS et al (2001) ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). *Pesq Vet Brasil* 21:33–37
27. Zhang H, Lee EG, Yu L et al (2011) Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. *Parasitol Res* 109:899–911