

DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA LINFADENITE CASEOSA

PABLO GILL¹; ALEXANDRE BRUM¹; ANDREA REZENDE¹; ALEX RODRIGUES¹;
 VASCO AZEVEDO²; SIBELE BORSUK¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Doença Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico-Biotecnologia–UFPel; ² Departamento de Biologia Geral, UFMG;
 (pablo.espinosa.gill@gmail.com - sibeleborsuk@gmail.com)

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade crônica que acomete, principalmente, ovinos e caprinos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais ocasionando grandes perdas econômicas (PEKELDER, 2000). O agente causador da LC é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a qual é gram positiva, não esporulada, aeróbica facultativa e parasita intracelular facultativa de macrófagos (ANDERSON et al., 2005).

A LC também é conhecida por “Mal do Carço” ou “Falsa Tuberculose” devido ao fato de formar granulomas nos linfonodos internos ou superficiais e em outros órgãos (ZARRAGA et al., 2006). É uma doença de fácil transmissão, já que a introdução de animais infectados compromete um rebanho sadio (PEKELDER et al., 2000; SOBRINHO, 2001). A identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho são os métodos mais efetivos para o controle da LC (POWELL, 1994). Essa identificação pode ser realizada, inicialmente, através do diagnóstico clínico, no qual se visualiza a presença de abscessos nos linfonodos superficiais do animal.

No entanto o diagnóstico clínico não é eficaz para detecção de todos os casos de LC (ZERBINATI et al., 2011). Desta maneira, se torna necessário o desenvolvimento de testes de diagnóstico para identificação de animais infectados, principalmente os casos assintomáticos. O teste de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) proporciona uma identificação precoce do contato dos animais com o agente etiológico.

A proteína CP1957 de *C. pseudotuberculosis* foi identificada como imunogênica em um estudo de secretoma e está presente na superfície da bactéria (SEYFFERT et al., 2011; SANTOS et al., 2012), assim devido a essas características possui potencial para uso em diagnóstico. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi a utilização da proteína recombinante CP1957 em um ELISA para diagnóstico de LC.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão e Purificação da proteína CP1957 em *E. coli*

O gene *cp1957* foi clonado no vetor pAE (RAMOS et al., 2004) e o vetor recombinante foi utilizado para a expressão da proteína rCP1957 em *E. coli* BL21 Star. A detecção da expressão das proteínas, bem como a pureza, foi observada através de SDS-PAGE 12% seguido de *Western blot* (WB) com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma). A purificação foi realizada por cromatografia

de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel. Após a confirmação da pureza as proteínas recombinantes foram dialisadas e armazenadas à -20°C.

2.2 Soros

Um total de 200 soros de ovinos a campo da região sul do estado do Rio Grande do Sul (oriundos da soroteca do Laboratório de Parasitologia, IB, UFPel) foram utilizados. Além destes, 30 soros de ovinos negativos foram utilizados para estabelecer o ponto de corte do ELISA.

2.3 ELISA indireto

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 1µg/mL da proteína CP1957 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 por 12-16h. Após foi realizado o bloqueio com PBS-leite em pó a 5%, durante uma hora a 37°C. Os soros foram ensaiados em duplicata, na diluição de 1:50 por 1h a 37°C, após 3 lavagens com PBS-T (tween 0,05%), adicionou-se o anticorpo anti-ovino conjugado com peroxidase, na diluição de 1:5000 em tampão PBS-T incubando-se por 1h a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, adicionou-se ortofenilenodiamina (OPD), na concentração de 0,4mg/ml, em tampão citrato-fosfato pH=4,0, acrescida do substrato peróxido de hidrogênio 30V a 0,01%. Após a reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro. A leitura da absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Thermoplate) com comprimento de onda de 450nm. Para controle da reação foi considerados os soros controle positivos e negativos adicionados em cada placa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção da proteína recombinante CP1957

A proteína CP1957 foi expressa por *E. coli* BL21 Star™ apresentando o tamanho esperado de 35 kDa (Figura 1). A proteína foi expressa na forma insolúvel, e a solubilização foi realizada com 8M de uréia. O rendimento obtido foi de 10,4 mg.L-1. Após purificação, a proteína foi dialisada contra tampão Tris-NaCl (Figura 2).

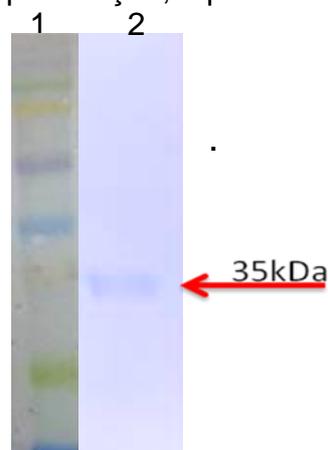


Figura 1 - Eletroforese SDS-PAGE 12% mostrando a proteína recombinante Cp1957 purificada. 1- Full Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE), 2- Proteína CP1957.

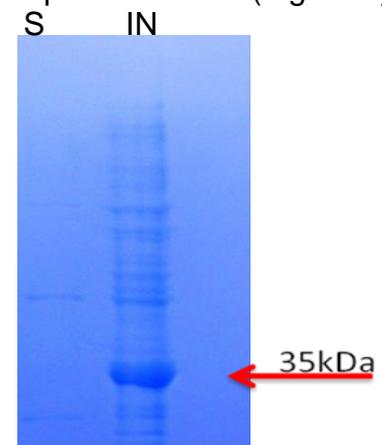


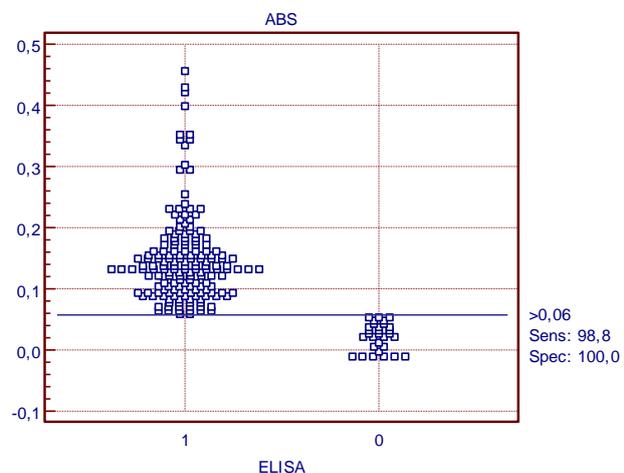
Figura 2 - SDS-PAGE 12% mostrando a solubilidade da proteína recombinante CP1957 clone 1 em *E. coli* BL21 Star. S - Fração Solúvel. IN- Fração Insolúvel.

3.2 Padronização do ELISA Indireto

Foram utilizados duzentos soros ovinos para a avaliação do ELISA. O *cut-off* de OD₄₅₀= 0,02 foi estabelecido pela média da absorbância dos soros negativos mais 2 desvios padrões. A média dos soros positivos foi de OD₄₅₀= 0,13. Dos 200 soros testados, 170 soros (85%) estavam acima do *cut-off* e foram considerados como positivos.

Os valores de sensibilidade e especificidade foram determinados pela análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*), usando o MedCalc software estatístico (versão 10.3.0.0) (www.medcalc.be). Baseado na análise ROC (Figura 3) o valor médio de ELISA OD₄₅₀ de >0,06 foi escolhido como *cut-off* para distinguir soros positivos de negativos apresentando valores de especificidade de 100% e sensibilidade de 98,8%.

Figura 3: Análise do ELISA indireto utilizando o *Receiver Operating Characteristic* (ROC), confirmando 170 soros positivos e 30 soros negativos. Soros positivos (1) e negativos (0).



O ELISA indireto desenvolvido neste trabalho utilizando a proteína recombinante CP1957 de *C. pseudotuberculosis*, apresentou uma especificidade de 100% e sensibilidade de 98,8%. Por outro lado Seyffert et al., (2011) utilizaram um teste ELISA para detecção de imunoglobulinas específicas totais para antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* e alcançaram 98,5% de especificidade e 93,5% de sensibilidade. Também em 2011, Zerbinati et al., desenvolveram um teste de ELISA para detecção de anticorpos em ovinos infectados com *C. pseudotuberculosis* e obtiveram uma sensibilidade de 98,0% e uma especificidade de 100%. Assim, o ELISA desenvolvido utilizando a proteína CP1957 apresentou um alto índice de especificidade e sensibilidade, podendo ser utilizado para o diagnóstico de LC.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o teste ELISA utilizando a proteína recombinante CP1957 possui especificidade e sensibilidade consideradas satisfatórias, revelando que esse é um teste de diagnóstico que pode identificar animais com LC em um rebanho, possibilitando assim, um melhor manejo desses animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D.E.; RINGS, D.M.; PUGH, D.G. *Enfermidades do sistema tegumentar*. In: PUGH, D. G. *Clínica de ovinos e caprinos*. 1. ed. São Paulo:Roca, 2005
- PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. *Diseases of Sheep*. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2000. p. 270-274.
- POWELL, J. Caseous Lymphadenitis in small ruminants. University of Arkansas, United States Department of agriculture, and County Governments Cooperating. *Agriculture and natural resources FSA3095*, 1994.
- RAMOS, C.R.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; HO, P.L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med –Biol Res* vol. 37 n.8 Ribeirão Preto, Brasil. Agosto, 2004.
- SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G., et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by Corynebacterium pseudotuberculosis secreted proteins-based ELISA. *Research Veterinary Science*. v.88, p.50–55, 2011.
- SANTOS, RA, CARNEIRO, A., GALA-GARCIA, A., PINTO, A., BARHAM, D., BARBOSA, E., ABURJAILE, F., DORELLA, F., ROCHA, F., GUIMARAES, L. , ZURITA-TURK, M., RAMOS, R., ALMEIDA, S., SMITH, S., PEREIRA, U., ABREU, VC, SILVA, A., MIYOSHI, A. AND AZEVEDO, V. The Corynebacterium pseudotuberculosis in silico predicted pan-exoproteome. *BMC. Genomics* 13 Suppl 5, S6., 2012.
- SOBRINHO, A. G. S. *Principais Enfermidades dos Ovinos*. In: *Criação de ovinos*. 2.ed. Jaboticabal: Funep, p.220-221, 2001.
- ZARRAGA CC, SCARAMELLI A, VALEIRON CR. Bacteriological characterization of Corynebacterium pseudotuberculosis in Venezuelan goat flocks. *Small Rumin Res*. v.5, p.65-170,2006
- ZERBINATI, J. ; GREVE, I.C.; LEAL, R.F.; AMORIN, L.M.P.V.; SILVA, D.L.; VIEGAS, S.R.A.A.; PEIXOTO, A.P.C.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R.B. Produção e padronização de um antígeno para um teste ELISA indireto no diagnóstico da Linfadenite Caseosa em soros caprinos. *Rev. Acad., Curitiba*, v.5, n.3, p285-293, Jul./Set. 2011.