

AVALIAÇÃO DE UM TESTE DE ELISA INDIRETO UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE CP1802 PARA DIAGNÓSTICO DE LINFADENITE CASEOSA

HENRIQUE RAMOS ANGELO¹, ALEXANDRE ANTUNES BRUM², ANDRÉA DA SILVA REZENDE³, KAREN LEAL⁴, FERNANDA KEGLES⁵, SIBELE BORSUK⁶

¹Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPEL hrangelo@gmail.com

²Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPEL alex.brum@bol.com.br

³Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPEL andreabiomedica@hotmail.com

⁴Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPEL karensleal@hotmail.com

⁵Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPEL fkegles@hotmail.com

⁶Centro de desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPEL sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica debilitante, que acomete principalmente caprinos e ovinos, causada pela bactéria intracelular *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A LC é uma doença que causa grandes perdas nos rebanhos mundialmente, a doença é caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonódos internos (ALVES, 2007).

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos e eficientes é de grande importância para a detecção da LC, pois muitas vezes a doença somente é detectada com diagnóstico clínico, que é um diagnóstico tardio neste caso. Métodos rápidos que possam ser utilizados para detectar a doença antes do aparecimento dos sintomas é de grande importância para a prevenção da doença e grandes perdas econômicas relacionadas a produção de leite, lã, peso e condenação das carcaças (FONTAINE, 2006).

A partir dos dados do sequenciamento de *C. pseudotuberculosis* identificou-se vários alvos em potencial como proteínas imunogênicas, dentre estes o gene cp1802 (SILVA, 2013), sendo esta uma provável proteína secretada pelo *C. pseudotuberculosis*.

O objetivo deste trabalho foi realizar um teste diagnóstico pelo método de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante CP1802, como antígeno para detecção da LC utilizando soros de ovinos,.

2. METODOLOGIA

2.1. Soros

Utilizou-se 44 soros de ovinos, sendo 34 de animais negativos para LC, e 10 de animais com sintomas clínicos de LC.

2.2. Expressão da proteína recombinante CP1802

O vetor pAE/1802 previamente construído foi utilizado para a expressão da proteína CP1802 em *E. coli*. Para isso, o DNA plasmidial (pAE/1802) foi utilizado para transformação por choque térmico na linhagem de expressão *E. coli* BL21 Star. A indução da expressão se deu pela adição de 1 mM de IPTG e o cultivo incubado em agitador orbital a 37°C por 3 h. A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada através da técnica de Western blotting, utilizando o anticorpo primário anti-histidina (1:3000) e secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase

(1:3000) para o reconhecimento da proteína. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel.

2.3 ELISAs

O ELISA utilizando a proteína recombinante CP1802 foi comparado ao ELISA que utiliza antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis*, conforme descrito por SEYFFERT et al. (2010), este foi considerado como padrão ouro. Para o ELISA utilizando a proteína CP1802 recombinante, placas de Poliestireno contendo 96 cavidades foram sensibilizadas com, 100 µL de da proteína CP1802 a uma concentração de 1mg/mL diluída em tampão carbonato bicarbonato pH=9,8 a 4°C por 16h. Após, a placa foi bloqueada com 100µL de uma solução de leite em pó 5% em tampão PBS a 37°C por 1 h, seguido de 3 lavagens com . Os soros foram utilizados na diluição 1:100 em PBS-T (Tween 0,05%) em duplicata após a placa foi mantida a 37°C por 1h, após a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T. Em seguida foi adicionado o anticorpo anti-ovino conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em PBS-T e mantida a 37°C por 1 h, após esta etapa a placa foi lavada 5 vezes com PBS-T. A solução de revelação possui contendo 0,02% de OPD, 12mL de tampão citrato fosfato e 30 µL de água oxigenada, a placa foi mantida no escuro por 15 minutos. A absorbância foi medida a 450nm utilizando um leitor de placas de ELISA (MindrayMicroplate Reader MR-96A).

2.4 Análise estatística

Para a avaliação da especificidade, sensibilidade e ponto de corte, os resultados dos 44 soros foram analisados sendo submetidos ao Receiver Operating Characteristic (ROC) utilizando o MedCalc estatística (versão 10.3.0). Esta análise traça devidamente os verdadeiros positivos dos verdadeiros negativos a fim de estipular o ponto de corte. Para avaliarmos a sensibilidade e a especificidade utilizamos o teste de ELISA com proteínas secretadas como padrão e, dessa forma, analisamos o teste de ELISA utilizando a proteína recombinante CP0369.

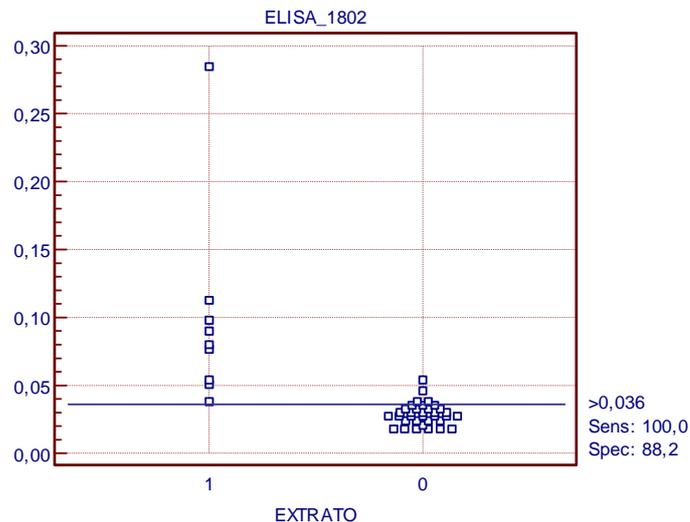
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do ELISA utilizando proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram comparados com os resultados obtidos com o ELISA utilizando a proteína recombinante CP1802. Os 44 soros foram avaliados através dos dois ELISAs (proteínas secretadas e CP1802). A análise de sensibilidade e especificidade foi avaliada através da análise ROC, a qual revelou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 88,2% utilizando um ponto de corte de $DO_{450}=0,036$ (figura 1).

Um ELISA utilizando antígenos obtidos por sonicação de um cultivo de *C. pseudotuberculosis* apresentou uma especificidade de 71% e uma sensibilidade de 83% (BINSS, 2007), poucos trabalhos utilizam proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* para testes de diagnóstico como ELISA, em uma das abordagens foram correlacionados 2 testes, 1 utilizando proteínas de células inteiras

e outro utilizando a proteína recombinante fosfolipase D (rPLD) os quais obtiveram uma sensibilidade de 81% e 97% e especificidade de 98% e 99% respectivamente (STING, 2012).

Figura 1: Análise dos testes de ELISA



Análise do ELISA-CP1802 usando as 44 amostras. O gráfico mostra a frequência de soros confirmados positivos (1) e soros confirmados negativos.

4. Conclusões

O ELISA indireto desenvolvido utilizando a proteína CP1802 se mostrou útil em diferenciar ovinos sadios de infectados, desse modo esse formato de ELISA pode ser utilizado de maneira eficiente como um teste de diagnóstico para a LC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, FSF; SANTIAGO, LB; PINHEIRO, RR; **Linfadenite Caseosa: O estado da Arte**; Embrapa Caprinos 2007.

STING, R., WAGNER, B., SARI-TURAN, A., STERMANN, M., REULE, M., EICHNER, M. and BEYER, W. (2012) **Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats in Baden-Wuerttemberg** (Germany) and seroreactions on antigens used for newly developed enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr. 125, 67-75.

SEYFFERT, N., GUIMARAES, A.S., PACHECO, L.G., PORTELA, R.W., BASTOS, B.L., DORELLA, F.A., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P., GOUVEIA, A.M., MEYER, R., MIYOSHI, A. AND AZEVEDO, V. (2010) **High seroprevalence of caseous**

lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sci. 88, 50-55.

SILVA, W.M., SEYFFERT, N., SANTOS, A.V., CASTRO, T.L., PACHECO, L.G., SANTOS, A.R., CIPRANDI, A., DORELLA, F.A., ANDRADE, H.M., BARH, D., PIMENTA, A.M., SILVA, A., MIYOSHI, A. AND AZEVEDO, V. (2013) **Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome.** Microb. Pathog. 61-62, 37-42.

FONTAINE, M.C., BAIRD, G., CONNOR, K.M., RUDGE, K., SALES, J. AND DONACHIE, W. (2006) **Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** Vaccine 24, 5986-5996.

BINNS, S.H., GREEN, L.E. AND BAILEY, M. (2007) **Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera.** Vet. Microbiol. 123, 169-179.