

UTILIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis*

BRAITE, Drielly C.¹; REZENDE, Andrea¹; ANGELO, Henrique, R.¹; CHIACCHIO, Simone B.² e BORSUK, Sibeles¹

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, , ²Departamento de Reprodução Animal, UNESP - Botucatu.
driellybraite@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

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

A LC também é conhecida por “Mal do Caroço” ou “Falsa Tuberculose” (VESCHI *et al.*, 2005) pela formação de granulomas nos linfonodos internos ou superficiais e em outros órgãos (MOTTA, *et al.*; 2010). É uma doença de fácil transmissão, já que a introdução de animais infectados compromete um rebanho sadio (PEKELDER *et al.*, 2000; SOBRINHO *et al.*, 2001). A ovinocaprinocultura no Brasil possui grande importância nas áreas social e econômica, já que é tradicionalmente destinada à produção de lã, seguida pela produção de carne (SEYFFERT *et al.*, 2009).

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.

Apesar da importância deste rebanho para a região sul do país, ainda não existe um diagnóstico clínico eficaz para LC (ZERBINATI *et al.*, 2007). Desta maneira, se torna necessária a busca pelo desenvolvimento de testes de diagnóstico para a localização de animais possivelmente infectados e remoção dos mesmos nos rebanhos. A proteína 1802 de *C. pseudotuberculosis* foi identificada como imunogênica e está presente na superfície da bactéria. Assim, o nosso objetivo foi a utilização da proteína 1802 recombinante em um ELISA indireto para diagnóstico de animais com LC.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Soros

Os soros foram coletados de ovelhas das raças Dorper e Santa Inês; tanto as saudáveis quanto as de rebanho contaminado pela Linfadenite Caseosa na Cidade de Botucatu – SP. Os mesmos foram estocados a -20°C até o momento do uso.

2.2 Expressão e Purificação da proteína 1802 em *E. coli*

O gene 1802 foi clonado no vetor pAE (RAMOS *et al.*, 2004) e o vetor recombinante foi utilizado para a expressão da proteína r1802 em *E. coli* BL21 Star. A detecção da expressão das proteínas, bem como a pureza, foi observada através

de um SDS-PAGE e por Western Blot utilizando o anticorpo monoclonal anti-6xhistag (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 armazenadas à -20°C.

2.3 Elisa Indireto

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 1µg/ml de antígeno TES 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 duplicatas, na diluição de 1:200 e o conjugado anti-humano na diluição de 1:5000 em tampão PBS/leite em pó 5%; tanto os soros, quanto o conjugado, foram incubados durante uma hora a 37°C. Entre todas as fases do teste, as placas foram lavadas por três vezes de cinco minutos cada com PBS-Tween (0,05%). Como cromógeno foi utilizado ortofenilenodiamina (OPD), na concentração de 0,4mg/ml, em tampão citrato-fosfato pH4,0, acrescida do substrato peróxido de hidrogênio 30V a 0,01%. Após a reação, a placa foi incubada em temperatura ambiente durante quinze minutos, ao abrigo da luz, e em seguida a reação foi interrompida com 50µl de ácido sulfúrico 1N. A leitura da absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Thermoplate) com comprimento de onda de 492nm. Para controle da reação foram considerados os soros controle positivos e negativos adicionados em cada placa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os testes baseados na técnica de ELISA podem ser quantitativos, simples, específicos, sensíveis e requerem pequenos volumes de amostras. Isto porque este teste apresenta ampla confiabilidade, e também, pode ser útil para a detecção de venenos e anticorpos. Com isso, atualmente tem se tornado uma técnica cada vez mais estudada para o diagnóstico de doenças através de padrões antigênicos.

Assim, foi avaliado um total de 39 soros de ovinos através da técnica de ELISA. Deste total existem 10 soros que são de animais clinicamente positivos para Linfadenite Caseosa; 7 de animais negativos e 22 soros são de animais de campo.

O ponto de corte de $OD_{492} = 0,03$ foi estabelecido pela média da absorbância dos soros negativos mais 2 desvios padrões. A média dos soros positivos foi de $OD_{492} = 0,055$ (Figura 1). Os dados preliminares do ELISA mostram que este tem o potencial de diferenciar os soros de animais positivos de negativos. Dos 22 soros testados, 6 soros (27.7%) estavam acima do ponto de corte e foram considerados como positivos.

A fofolipase D já foi utilizada como diagnóstico em comparação com o lisado celular de *C. pseudotuberculosis* e apresentou bons resultados (STING *et al.*, 2012). Nossos resultados são promissores e pretende-se testar as proteínas totais de *C. pseudotuberculosis* em um ELISA com a finalidade de validação do teste de ELISA aqui desenvolvido.

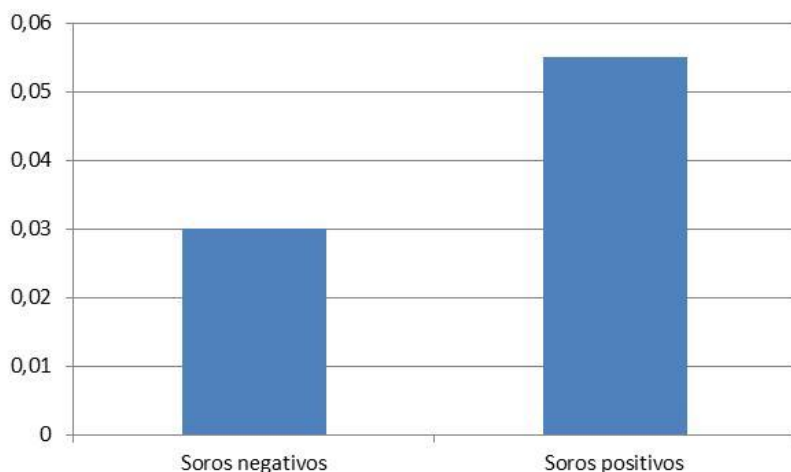


Figura 1: Médias dos soros de animais clinicamente positivos e negativos no ELISA indireto.

4 CONCLUSÃO

Os resultados preliminares do ELISA indireto utilizando a proteína r1802 foram promissores. Os soros positivos foram diferenciados dos soros negativos, mostrando que esse é um teste de diagnóstico que pode identificar animais com Linfadenite Caseosa em um rebanho, possibilitando um melhor manejo desses animais.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite Caseosa: O estado da arte. EMBRAPA - Documento 74. ISSN 1676-7659. Setembro, 2007.

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.

MOTTA, R.G.; CREMASCO, A.C.M.; RIBERTO, M.G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. Veterinária e Zootecnia 200/213. ISSN0102-5716; Junho, 2010.

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. HO. 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.C., PORTELA, R.W., BASTOS, B.L., DORELLA, F.A., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P., GOUVEIA, A.M.G., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. 2009. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. 81, 50-55.

SOBRINHO, A. G. S. Principais Enfermidades dos Ovinos. In: Criação de ovinos. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2001. p.220-221.

STING, R.; WAGNER, B.; SARI-TURAN, A.; STERMANN, M.; REULE, M.; EICHNER, M.; BEYER, W. 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. Jan./Feb. 2012.

VESCHI, J.L. Linfadenite Caseosa. In: VII ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA, 2005, Espírito Santo do Pinhal. Anais. Disponível em <http://www.caprtec.com.br/pdf/cabras_homeopatia.pdf>. Acesso em 02/07/2012.

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. 2007.