

UTILIZAÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA O MONITORAMENTO VACINAL DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECTIOSA DAS GALINHAS

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO¹; PAULA FONSECA FINGER¹;
CAROLINA GEORG MAGALHÃES¹; MARCELO MENDONÇA¹, PAULO
AUGUSTO ESTEVES², FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CD Tec, UFPel - morganaludtke@gmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, CNPSA - pesteves@cnpsa.embrapa.br

³Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CD Tec, UFPel - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é uma importante atividade econômica e se encontra em constante crescimento no setor do agronegócio brasileiro e, atualmente, o Brasil está entre os três maiores produtores de frango de corte do mundo, atrás somente dos EUA e da China (GIROTTTO et al., 2004).

Existem inúmeras doenças de impacto econômico que acometem a população aviária, dentre elas, destaca-se a bronquite infecciosa das galinhas (BIG). Esta doença é altamente contagiosa e afeta primeiramente o sistema respiratório, mas também outros sistemas, como o reprodutor, causando diminuição na produção de ovos.

A BIG é causada pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV), que é composto por quatro proteínas estruturais: do nucleocapsídeo, de membrana, de superfície e do envelope (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000). A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo (MCKINLEY et al., 2008). É composta por 409 aminoácidos com uma massa molecular predita de cerca de 50 kDa (BOURSNELL et al., 1985). Usualmente, tal proteína apresenta homologia entre as diferentes cepas de IBV, sendo uma proteína bastante imunogênica e abundantemente expressa durante o processo de infecção viral (WILLIAMS et al., 1992).

Todas as aves são vacinadas no primeiro dia de vida, sendo que a única cepa permitida para vacinação no Brasil é a Massachusetts (M41). A vacinação é a estratégia adotada para prevenção e controle da infecção pelo IBV, porém não tem sido eficiente para combater a infecção pelo vírus, o que torna necessário o monitoramento dos níveis de anticorpos das aves vacinadas (BANDE et al., 2015). Atualmente este monitoramento é realizado através de *Kits* comerciais de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) importados, o que aumenta o custo deste método. Assim, o objetivo deste estudo foi expressar a proteína N recombinante do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, a fim de obter um antígeno que possa ser utilizado em um teste nacional do tipo ELISA para monitoramento vacinal das aves.

2. METODOLOGIA

2.1 Amplificação do gene da proteína N

Através do RNA viral extraído do líquido córioalantoide (LCA) infectado com a amostra do mesmo perfil da estirpe M41 do IBV foi obtido cDNA por transcrição reversa (RT), usando oligonucleotídeo randômico para, em seguida, ser amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) toda a *orf* do gene da proteína N. Com base na sequência do gene da proteína N da estirpe M41 do IBV

(“GenBank” n° de acesso – M28566) foram desenhados os *primers forward* e *reverse*. A PCR foi realizada em uma solução com volume final de 50 µL, contendo 0,2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq DNA Polimerase, MgCl₂ a 3,5 mM, Buffer 1X, 5 M de Betaine e 0,2 pmol de cada primer. A essa solução foi adicionado 3 µL de cDNA, submetendo a uma desnaturação inicial de 95°C por 7 minutos, 70°C por 1 minuto, 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

2.2 Clonagem do gene da proteína N

O produto amplificado foi purificado através do Kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare, USA). O produto da PCR e o vetor pAE de expressão em *E. coli* foram digeridos com enzimas de restrição *Xhol* e *KpnI*, e então ligados com T4 DNA ligase. O produto da ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, a cepa TOP 10F de *E. coli*. Os transformantes foram selecionados em placas com meio Luria Bertani (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio) suplementado com ampicilina.

2.3 Expressão da proteína N

O plasmídeo recombinante contendo o gene de interesse foi utilizado para transformar a linhagem BL21 Star de *E. coli*. Clones transformantes foram selecionados e, em seguida, cultivados em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL ampicilina, sob agitação de 250 rpm a 37°C, durante 16 horas. Em seguida, todo o volume foi transferido para 200 mL de meio LB contendo ampicilina. Quando a D.O₆₀₀ chegou a 0,8, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,5 mM. As culturas foram incubadas por mais 3 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm e ao final, submetidas ao processo de extração de proteínas, conforme os procedimentos de solubilização.

A expressão da proteína foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western Blot*. Posteriormente, a proteína N recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade com níquel (Ni⁺²) e quantificada.

2.4 Desenvolvimento do ELISA indireto

Os soros utilizados para a realização do ELISA foram enviados por um laboratório responsável pelo diagnóstico de bronquite infecciosa através de um *Kit* comercial de ELISA (IDEXX Laboratories, USA).

Microplacas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 ng de rN diluída em tampão carbonato-bicarbonato com um volume de 100 µL por poço, sendo deixadas *overnight* a 4°C. As placas foram bloqueadas com solução de leite em pó 5% diluído em PBS-T e incubadas a 37°C por 1 h. Os soros diluídos 1:200 foram adicionados em duplicata, e as placas incubadas novamente a 37°C por 1 h. O anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase foi diluído 1:10.000 seguido de incubação a 37°C por 1,5 h. Ao final de cada etapa as placas foram lavadas com em PBS + Tween 0,05% (v/v) (PBS-T) por 3 vezes. Por fim, para revelar a reação, foi adicionado o cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂). A reação foi interrompida com a solução de H₂SO₄ 2 N e analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento esperado de 1.240 pb (dados não mostrados) foi amplificado na reação de PCR utilizando os *primers* desenhados para obtenção do gene correspondente à região codificadora da proteína N.

Os resultados da análise por SDS-PAGE demonstraram a presença de uma banda cuja massa molecular correspondeu a aproximadamente 45 kDa (Figura 1A). O mesmo resultado foi obtido na reação de *Western blotting* frente a anticorpo monoclonal Anti-6xHis (Figura 1B).

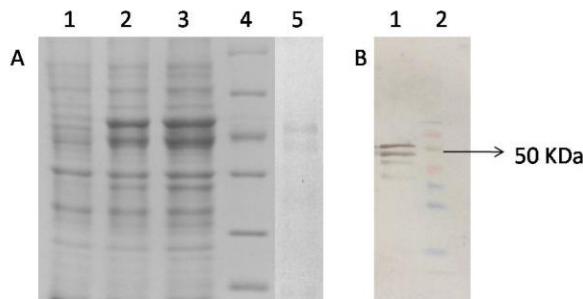


Figura 1. Análise da expressão da rN. A- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da expressão da proteína N em *E. coli* BL21 Star 1- Cepa *E. coli* BL21 Star, 2- cultivo de N não induzido, 3- cultivo de N induzido, 4- Marcador, 5- N purificada. B- *Western Blot* frete a Mab Anti-6xHis 1- Proteína N, 2- Marcador

A análise de expressão e purificação da proteína N recombinante através de SDS-PAGE e *Western blot* mostrou duas bandas, 63 e 58 kDa, onde a menor banda parece ser a forma truncada da proteína N, conforme já reportado por CHEN et al. (2003) e ZHANG et al. (2005).

Os soros testados no ELISA utilizando a proteína rN foram comparados com os resultados obtidos utilizando o Kit comercial IDEXX. Dos 75 soros positivos, o ELISA rN identificou 73, obtendo uma sensibilidade de 97% no teste desenvolvido. Já dos 23 soros negativos, o ELISA rN identificou 22, apresentando uma especificidade de 95% (Figura 2).

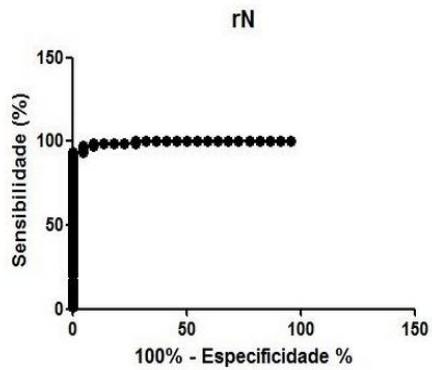


Figura 2. Curva de Características de Operação do Receptor (ROC) do ELISA com a rN comparado ao IDEXX, obtendo 95% de especificidade.

No presente estudo, foi desenvolvida uma técnica de ELISA utilizando uma proteína recombinante de papel importante na infecção pelo vírus, a nucleoproteína (N) (SCHELLE et al., 2005). Os resultados obtidos demonstram que o teste pode ser adotado como diagnóstico a fim de monitoramento vacinal

para IBV, substituindo técnicas de custo elevado para o produtor. Contudo, mesmo com elevados valores de sensibilidade e especificidade do ELISA rN, o número de soros testados ainda é baixo, sendo necessário mais testes para a validação do ensaio desenvolvido.

4. CONCLUSÕES

Esses resultados demonstram que um teste mais eficaz utilizando apenas uma porção do IBV pode ser capaz de detectar anticorpos em soros de aves, sendo uma alternativa ao monitoramento da bronquite infecciosa das galinhas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; BEJO, M. H.; MOEINI, H.; OMAR, A. R. Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. **Journal of Immunology Research**, 2015.

BOURSNELL, M., BINNS, M., FOULDS, I., BROWN, T., 1985. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of General Virology**. v.66, n.3, p.573-580, 1985

CHEN, H., COOTE, B., ATTREE, S., HISCOX, J.A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.** v.35, p.519–526, 2003.

DI FABIO J and ROSSINI LI. Bronquite infecciosa das galinhas. **Doenças das aves**, Campinas: Facta, 2000.

GIROTTI, A. F.; MIELE, M. Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. **Anuário Avicultura Industrial**, n.11, p.20-28, 2004.

LIN, Y.; LI, B.; WANG, J.; YE, J.; WANG, M.; WANG, J.; ZHANG, Y.; ZHU, J. Neutralization Analysis of a Chicken Single-Chain Variable Fragment Derived from an Immune Antibody Library Against Infectious Bronchitis Virus. **Viral Immunology**, 2015.

MCKINLEY, E.T.; HILT, D. A.; JACKWOOD M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v.26, p.1274-1284, 2008.

SCHELLE, B., KARL, N., LUDEWIG, B., SIDDELL, S. G., THIE, V. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. **Journal of Virology**. v.79, n.11, p.6620–6630, 2005.

WILLIAMS, A. K., Li, W., SNEED, L. W., COLLISSON, E. W. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Research**. v.25, p.213-222, 1992.

ZHANG, D.Y., ZHOU, J.Y., FANG, J., HU, J.Q., WU, J.X., MU, A.X. An ELISA for anti-bodies to infectious bronchitis virus based on nucleocapsid protein produced in Escherichia coli. **Vet. Med. Czech**. v.26, p.336-344, 2005.