

DEMONSTRAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIGÊNICAS DA rNPCDV POR ELISA INDIRETO

LAURA MORAIS NASCIMENTO SILVA¹; MAUREEN HOCH VIEIRA FERNANDES²;
RODRIGO CASQUERO CUNHA³; MARCELO DE LIMA⁴; SILVIA DE OLIVEIRA
HÜBNER⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – lmoraisns@gmail.com

² South Dakota State University

³ Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (*canine distemper virus*, CDV) é relacionado a enfermidades em canídeos domésticos e selvagens, e em mamíferos da família *Felidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae* e *Viverridae*. Pertencente à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* e ao gênero *Morbillivirus*, o CDV tem genoma RNA e envelope lipoproteico. Em cães domésticos os principais sintomas observados são febre, anorexia, diarreia, vômito, desidratação, depressão, sinais respiratórios como pneumonia, hiperqueratose nasal e dos coxins, sinais nervosos como mioclonias e incoordenação (FLORES, 2007).

A proteína do nucleocapsídeo (NP) está associada com o genoma do CDV, formando o nucleocapsídeo, sendo responsável pela proteção do material genético contra a digestão de enzimas (FLORES, 2007). Ela é produzida em grande quantidade nas células do hospedeiro (STETTLER; ZURBRIGGEN, 1995), sendo expressa logo no início do ciclo de replicação viral (LATHA et al., 2007b).

Nesse trabalho foi utilizada uma proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose expressa de forma recombinante (rNPCDV). A rNPCDV avaliada é resultado de uma região conservada do gene da nucleoproteína do CDV (NP do CDV) que, após ser selecionada, teve o códon otimizado e o gene sintético resultante foi inserido em um vetor pAE e clonado em cepas de *Escherichia coli* TOP10F (FERNANDES, 2015).

Uma importante técnica de diagnóstico sorológico é o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), que apesar de ter sido desenvolvido para detecção de antígenos, sua maior utilização é empregada na detecção de anticorpos (FLORES, 2007). De acordo com MESSLING et al. (1999), a técnica de ELISA é amplamente utilizada na detecção de anticorpos contra o CDV e outros morbilivírus. Além disso, já foi relatado o uso da NP do CDV no diagnóstico imunológico de cães infectados. (LATHA et al. 2007b)

O objetivo deste trabalho foi demonstrar as propriedades antigênicas da rNPCDV através da técnica ELISA indireto

2. METODOLOGIA

Animais e amostras sorológicas

Foram analisadas amostras de soro de 35 canídeos domésticos, com histórico positivo de cinomose ou vacinados contra o CDV. A coleta foi realizada tanto no

Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas (HCV UFPEL), quanto à domicílio, com autorização dos tutores. As amostras de sangue foram coletadas pela veia cefálica e então armazenadas em tubos sem substância anticoagulante, para obtenção dos soros, que foram armazenados à temperatura de -20°C até seu uso. Como controle positivo foram utilizadas amostras dos soros de 4 cães com histórico de vacinação recente. Cinco amostras de soro obtidas de filhotes sem vacinação foram utilizadas como controle negativo. Em ambos controles a confirmação foi dada através do teste de soroneutralização.

Antígeno rNPCDV

Uma região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina (NP) foi expressa em *E. coli* cepa Star e purificada por cromatografia de afinidade (rNPCDV). A expressão da rNPCDV foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *western blot* utilizando anticorpos monoclonais anti *His-Tag* (FERNANDES, 2015).

ELISA indireto com soros de cães domésticos

A rNPCDV foi utilizada para a sensibilização de microplacas de 96 cavidades na concentração de 0,5µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6, 100µl/poço, à 4°C *overnight*. Decorrido o período, a placa foi lavada com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. Foi feito bloqueio com 100µl/poço de solução de PBS-T e leite em pó desnatado a 5% por 1h à temperatura ambiente, seguido de três lavagens com PBS-T. Após, foram adicionadas as amostras de soro no volume de 50µl diluídas a 1:20 em PBS-T. Após 1h de incubação a 37°C, as placas foram lavadas e, em seguida, adicionados 50µl/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG de cão conjugada à peroxidase diluída a 1:2000 em PBS-T. Depois da incubação por 1h à temperatura de 37°C, foram feitas três lavagens. A revelação foi feita com 100µl/poço de solução contendo peróxido de hidrogênio a 0,15% em orto-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato-fosfato, pH 5,0. Após 15 minutos a placa foi lida em espectrofotômetro com filtro de 450nm. As diluições utilizadas foram determinadas anteriormente por "checkboxing". O ponto de corte foi o valor da média dos controles negativos em soma com dois desvios padrão destes mesmos controles.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante destacar que a rNPCDV, uma vez comprovada sua antigenicidade, pode ser aplicada em estudos para verificação do status sorológico de cães frente ao vírus da cinomose canina. No presente estudo, dos 35 soros avaliados, apenas o soro de um cão não reagiu contra a proteína rNPCDV, o que representa 97,15% de animais com anticorpos capazes de reconhecer a rNPCDV. A negatividade sorológica de um dos animais (2,85%), pode ser efeito de uma falta de soroconversão ou um resultado falso-negativo.

Outros pesquisadores encontraram resultados semelhantes com relação a antigenicidade da proteína NP. MESSLING et al. (1999), descrevem que a detecção de anticorpos contra o CDV é baseada no ensaio de soroneutralização e, que o ELISA não possui grande aceitação. Relatam ainda que este fato se deve, em parte, à fonte de antígenos virais, que exige purificação por centrifugação por gradiente de densidade à partir de sobrenadantes de culturas de células Vero infectadas, para

evitar reações falso-positivas e baixa especificidade. Por esse motivo, desenvolveram um ensaio de ELISA de captura utilizando a proteína N recombinante do CDV produzida no sistema de baculovírus. O ensaio resultante provou ser superior ao de soroneutralização no que diz respeito à sensibilidade e especificidade.

De acordo com LATHA et al. (2007b), o teste de ELISA-IgM realizado com proteína NP do CDV recombinante, produzida com a região mediana conservada e funcional mostrou uma forte correlação e boa concordância comparado ao antígeno de cultura em células Vero. O mesmo ocorreu com LATHA et al. (2007a), que inseriram o gene da proteína no vetor pRSET B, clonaram-na em uma cepa *E. Coli* DH5 α e testaram-na através do ELISA para detecção de IgG, demonstrando que a proteína N recombinante possui propriedades antigênicas assim como a rNPCDV utilizada neste ensaio. Por esta razão, os autores recomendam seu uso no sorodiagnóstico nos casos de cinomose canina.

O ensaio de ELISA indireto realizado por YI et al. (2016) mostrou que os soros de rato anti-CDV foram capazes de reconhecer um epítipo linear mínimo da proteína N recombinante produzida em *E. coli* BL21, e afirmam que esta estrutura viral pode ser usada no diagnóstico de CDV e também de outros morbilivírus.

4. CONCLUSÕES

O ELISA indireto realizado no presente estudo demonstrou que a rNPCDV possui características antigênicas para reagir com IgG de cães que foram imunizados contra o vírus da cinomose. Os resultados indicam que a rCDVNP avaliada neste estudo possui potencial para ser utilizada em ensaios de imunodiagnóstico da cinomose canina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERNANDES, M.H.V. **Propriedades antigênicas e imunogênicas de uma proteína N do vírus da cinomose canina expressa em sistema procarioto**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R.B. Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. **Veterinary Microbiology**, v.120, n.3 p.251–260 2007a.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R.B. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.119, n.3, p.278-286, 2007b.

MESSLING, V. von; HARDER, T.C.; MOENNIG, V.; RAUTENBERG, R.; NOLTE, I.; HAAS, L. Rapid and Sensitive Detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against Canine Distemper Virus by a New Recombinant Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinic Microbiology**, v.37, n.4, p.1049-1056, 1999.

PARDO, M.C.; BAUMAN, J.E.; MACKOWIAK, M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.8, p.833-836, 1997.

STETTLER, M.; ZURBRIGGEN, A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. **Veterinary Microbiology**, Suíça, v.44, n.2, p.211-217, 1995.

YI, L.; CHENG, Y.; ZHANG, M.; CAO, Z.; TONG, M.; WANG, J.; ZHAO, H.; LIN, P.; CHENG, S. Identification of a novel canine distemper virus B-cell epitope using a monoclonal antibody against nucleocapsid protein. **Virus Research**, v.213, p 1-5, 2016.