



Foto: Alice Andrioli Pinheiro

COMUNICADO
TÉCNICO

190

Sobral, CE
Setembro, 2019

Embrapa

Técnica de microfiltração seriada para purificação da proteína p28 do vírus da Artrite Encefalite Caprina

Alice Andrioli
Luís Antônio de Oliveira Alves
Maria Fátima da Silva Teixeira
Raymundo Rizaldo Pinheiro
Ronaldo Pereira Dias

Técnica de microfiltração seriada para purificação da proteína p28 do vírus da Artrite Encefalite Caprina¹

¹Alice Andrioli, médica-veterinária, doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE

Luís Antônio de Oliveira Alves, biólogo, doutor em Ciências Médicas, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE

Maria Fátima da Silva Teixeira, médica-veterinária, doutora em Biologia Humana, professora da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE

Raymundo Rizado Pinheiro, médico-veterinário, doutor em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE

Ronaldo Pereira Dias, biólogo, doutor em Reprodução e Sanidade Animal, bolsista da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

Introdução

O Lentivírus caprino (LVC) é o agente etiológico da Artrite-Encefalite Caprina (AEC), enfermidade incurável, crônica, de alta prevalência em rebanhos leiteiros nacionais e associada a perdas econômicas (Lima et al., 2018). Infecções por LVC são complexas e difíceis de controlar, em virtude de não existir uma vacina eficaz, induzindo infecções persistentes e que escapam da neutralização pelo sistema imunológico (Pinheiro et al., 2012).

O controle da AEC depende da sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico utilizados, do intervalo e da frequência dos monitoramentos sorológicos, assim como, pela adoção de medidas de prevenção da transmissão, principalmente por meio da termização do

colostro e do leite, e do sacrifício de animais infectados. O diagnóstico sorológico da AEC é bastante utilizado por ser mais prático e de menor custo. Apesar de ser possível a detecção de uma grande variedade de anticorpos, os principais entraves do uso desses testes são a soroconversão tardia, flutuações dos níveis de anticorpos em animais cronicamente infectados e a variabilidade genética dos lentivírus de pequenos ruminantes (Rodrigues et al., 2018). Os antígenos mais utilizados para o diagnóstico são compostos basicamente pelas proteínas estruturais p28 e gp135. O teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) é o exame recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal – OIE e o mais utilizado em razão de seu baixo custo e rápido resultado (Arruda et al., 2011), entretanto, é conhecido

por ter baixa sensibilidade (Pinheiro et al., 2012).

Neste estudo, objetivou-se purificar a proteína antigênica p28 do LVC, pela técnica de microfiltração seriada em membranas AMICON, substituindo a ultracentrifugação em colchão de sacarose (UCCS), para a obtenção de um antígeno a ser empregado em teste ELISA indireto (ELISA-i).

Material e métodos

Cultivo celular e produção de antígeno

O sobrenadante viral foi produzido utilizando células de membrana sinovial obtidas por explant de cabritos recém-nascidos comprovadamente negativos para Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) pelos testes de IDGA, Western Blotting e PCR, seguindo as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará – CEUA/UECE (protocolo de N°10030861-9).

Essas células foram inoculadas com a cepa padrão CAEV-Cork¹, de título inicial $10^{5.3} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$, as quais apresentaram efeito citopático identificado por

sincícios e lise celular, conforme descrito por Pinheiro et al. (2010), ao final de 21 dias de cultivo. Os sobrenadantes virais foram submetidos, por três ciclos de congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 3.300G a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante uma hora, para retirada dos debris celulares, sendo então armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da filtração para separação das frações proteicas do vírus da CAE.

Obtenção da proteína P28 do vírus da CAE por microfiltração seriada

Após a etapa de clarificação, o sobrenadante foi submetido a microfiltrações seriadas. O volume inicial de 1.890 mL de sobrenadante foi filtrado com uso de membranas de 100 kDa, 50 kDa e 10 kDa, respectivamente, usando o sistema AMICON modelo 8400 (Millipore® Bedford, MA) com pressão positiva de gás nitrogênio (membrana de 100 e de 10kDa) e por centrifugação (membrana de 50 kDa). Todo o processo foi realizado sob refrigeração, a fim de se evitar a desnaturação das proteínas do antígeno.

A primeira filtração, em membrana AMICON de 100 kDa, reteve solutos acima de 100 kDa e permitiu a passagem de todas as proteínas de menor tamanho. A fração abaixo do “cut-off” da membrana, que saiu da câmara passando por ela, foi utilizada na etapa seguinte de filtração, utilizando a membrana capaz

¹ Amostra do vírus CAEV-Cork gentilmente cedida pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, oriunda do *Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants* – INRA – ENVL – França.

de filtrar solutos de peso molecular de 50 kDa, dessa vez por centrifugação a 3.300 G a 4 °C durante uma hora. Após a terceira filtração, agora em membrana AMICON de 10 kDa, o volume de sobrenatante retido na câmara que continha as frações de antígeno entre 50 kDa e 10 kDa, totalizava 50 mL. O antígeno contido no sobrenadante obtido após essa tripla filtração correspondeu à faixa de peso molecular da proteína alvo p28 de 28 kDa, sendo então concentrados 2.200 vezes em relação ao volume original por liofilização.

Dosagem de proteína total, SDS-PAGE e Western Blot (WB)

A dosagem da proteína total do antígeno microfiltrado (AgMi) foi determinada pela metodologia de Bradford (1976). Após, o AgMi, amostras de antígeno ultracentrifugado em colchão de sacarose (AgUCCS) e o padrão broad-range (14.4 a 97 kDa - LMW Electrophoresis da Pharmacia Biotech®) foram fracionados por eletroforese em gel de poli(acrilamida a 12% (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Um dos géis foi corado usando azul de Comassie, segundo Harlon e Lane (1998), para visualização das bandas. Os outros foram submetidos à transferência passiva (Tesoro-Cruz et al., 2009), para realização do WB.

Bloquearam-se as membranas com solução PBS Tween 0,3%, durante 60 min e lavaram-se com solução PBS Tween 0,05% por 5 min em três ciclos. O

soro positivo do kit comercial² foi diluído na concentração de (1:100) e adicionado às membranas, sendo incubado por 90 min. a 37 °C, sob constante agitação. Após as membranas, foram novamente lavadas, como supracitado, para adição do conjugado AntisSheep IgG Peroxidase produzido em burro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na diluição (1:1500) em PBS incubando por 60 min. Após as membranas, foram novamente lavadas com solução PBS Tween 0,05% e PBS, respectivamente, por duas vezes durante cinco minutos. A reação de cor foi realizada ao abrigo da luz com adição do substrato DAB/4-Cloronaphthol e Peróxido de Hidrogênio a 30%, parando a reação com água destilada.

Elisa indireto (Elisa-i)

Utilizou-se a metodologia padronizada por Alves (2011). Foram usadas placas de poliestireno de 96 poços (NUNC-MAXISORP™) sensibilizadas com 1 µg/poço por 1 h a 37 °C e incubadas a 8 °C overnight. As placas foram lavadas com solução PBS-Tween 0,05% duas vezes e incubadas novamente com solução de bloqueio (caseína 2% em PBS) por 90 min. a 37 °C. Após esse período, a placa foi lavada com solução PBS-Tween 0,05% duas vezes,

² *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc*, USA. Composto por antígeno (p28 e gp135), soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp135), soro positivo (soro rico em anticorpos contra as proteínas p28 e gp135) e soro negativo (soro sem anticorpos contra as proteínas p28 e gp135).

acrescentando, em seguida, os soros com a diluição de 1:100 e incubados por mais 60 min a 37 °C. Os soros positivo, reagentes e negativos do kit de IDGA (Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA), foram usados como controle. Continuamente, os poços foram lavados, desta vez por cinco vezes, e incubados com conjugado (Donkey Anti-Sheep IgG Peroxidase - SIGMA^o) na diluição de 1:1500 por mais 1h a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas por cinco vezes e reveladas em câmara escura por 18 minutos com substrato OPD (2 mg de O-phenylenediamine em presença de 4 µL de H₂O₂) e com 10 mL de tampão citrato, seguida de adição do ácido sulfúrico (H₂SO₄ 4N) como inibidor da reação, e leitura a 490 nm em espectrofotômetro. O ponto de corte realizado a partir da análise sorológica de 119 animais comprovadamente negativos foi de 0,352.

Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do AgMi

Um total de 188 soros de animais positivos e negativos, comprovado pela técnica de WB com AgUCCS, foi comparado pelos testes do Qui-Quarado (χ^2) (Tyler; Cullor, 1989), a fim de avaliar a sensibilidade e especificidade relativas do AgUCCS em relação ao Ag microfiltrado, assim como o índice de concordância e índice Kappa entre os dois resultados (Caquineau et al., 1988).

Resultados

Purificação, concentração e dosagem de proteínas.

A concentração do antígeno, após a microfiltração seriada e subsequente liofilização, resultou em um volume final de 800 µL, correspondendo, aproximadamente, a um volume 2.362 vezes menor que a quantidade inicial. No tocante à dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, o antígeno purificado AgMi mostrou uma concentração de 30,87 µg/µL.

SDS-PAGE e Western Blotting

O perfil eletroforético exposto pelas proteínas do AgMi, exhibe um modelo de bandas com pesos moleculares aproximados de 14.4 kDa a 97 kDa (Figura 1).

O antígeno AgMi com 30,87 µg/µL foi diluído para uma concentração final de 20 µg/poço, para melhor visualização das bandas. Para o AgUCCS também foi utilizada essa mesma concentração.

Entre as proteínas observadas, destacou-se a banda proteica com peso molecular de 28 kDa que demonstrou capacidade antígenica no teste de Western Blotting, como mostra a Figura 2. A porção referente a 135 kDa, testada com uso de soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp135) foi fracamente observada).

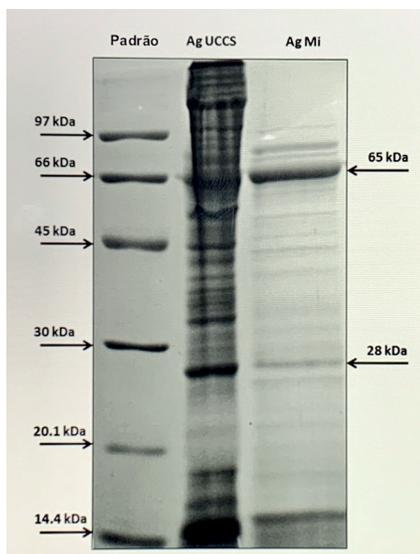


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Comparação do perfil proteico entre o antígeno Ultracentrifugado (UCCS) e o Antígeno Microfiltrado (AgMi).

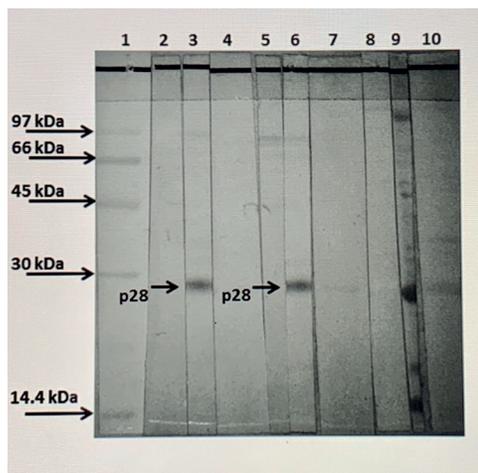


Figura 2. Western Blot de antígenos CAEV Microfiltrado – AgMi (Colunas 2 a 7) e Ultracentrifugado - AgUCCS (Colunas 8 a 10). Coluna 1 (Padrão de proteína); Colunas 2, 5 e 8 (soro caprino negativo); Colunas 4, 7 e 10 (soro reagente); Colunas 3, 6 e 9 (soro positivo).

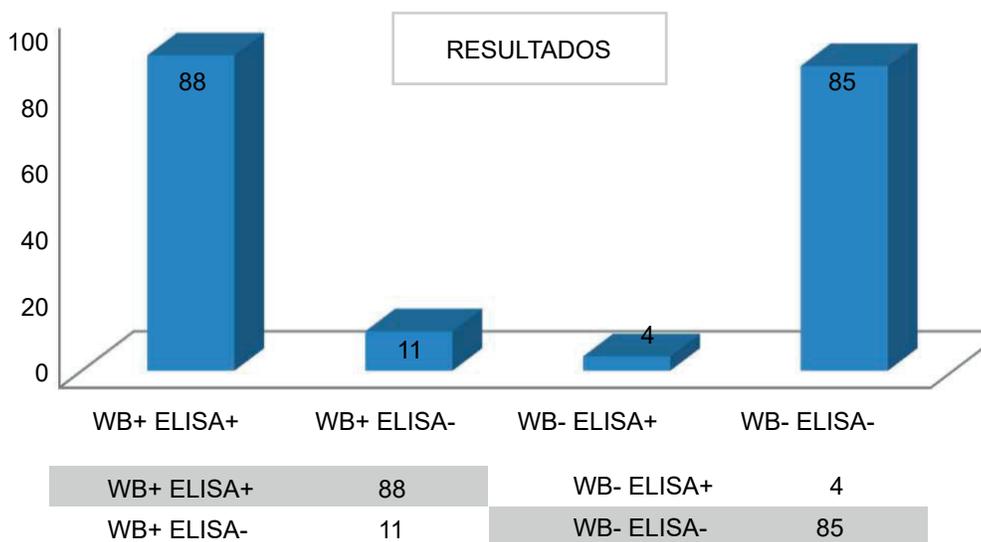
O teste de WB utilizando AgMi, demonstrou que alguns animais apresentaram anticorpos para a porção referente à proteína p28, mostrando a positividade para a CAE, sendo que esses animais foram testados com a mesma técnica, utilizando-se outro antígeno de procedência mais onerosa e laboriosa (AgUCCS) tendo resultado semelhante.

Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISAI com AgMi frente ao WB com o antígeno UCCS

O teste ELISA indireto realizado a partir de AgMi foi capaz de detectar um número de 88 animais positivos num total de 99 animais; e 85 animais negativos de um total de 89 animais previamente negativados por WB (AgUCCS), mostrando uma sensibilidade de 95,6% e especificidade de 88,5%, respectivamente, assim como valor preditivo positivo de 88,9% e valor preditivo negativo de 96,5%, com índice Kappa de 0,841, o que demonstrou uma boa concordância entre os testes. Os dados mostraram-se significativos para o Qui-Quadrado ($p < 0,001$). A comparação entre o resultado dos testes WB (AgUCCS) e ELISA AgMi são mostrados na Figura 3.

Conclusão

A técnica utilizada na preparação de antígeno por microfiltração seria demonstrou-se satisfatória para a



Qui-quadrado entre os testes: 130,23 ($p < 0,001$).

Figura 3. Comparação dos resultados entre as técnicas de Western Blotting (AgUCCS) e ELISA (AgMi).

separação da proteína p28 do CAEV. O teste ELISAi com o AgMi demonstrou alta sensibilidade e boa especificidade, podendo ser utilizado como teste de diagnóstico seguro e eficaz da CAE, apresentando um índice de concordância de 92% em relação ao teste de Western Blotting.

Referências

ALVES, L. A. O. **Produção de antígeno e separação da proteína p28 através de micro-filtragem seriada para sorodiagnóstico da Artrite Encefalite Caprina.** 2011. 73 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

ARRUDA, E. T. de; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A. do; CAMPOS, A. C.;

CASTRO, R. S. de. Avaliação de uma microimuno-difusão em gel de ágar para Diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 560-565, jul./set. 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, May, 1976.

CAQUINEAU, L.; DOUART, A.; LECOANET, J. Mice au point d'une méthode immunoenzymatique E.L.I.S.A. pour la détection des anticorps anti virus B.V.D. dans le serum des bovines. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 164, p. 381-386, 1988.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual.** 4. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726 p.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LIMA, C. C. V. de; AYRES, M. C. C.; PINHEIRO, R. R.; COSTA, N. C.; SOUZA, T. S. de; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, D. A. A.; SANTOS, V. W. S. dos. Transmission of caprine arthritis encephalitis virus between sheep. **Ciência Rural**, v. 48, n. 10, e20180053, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180053>

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAGÃO, M. A. C.; MARTINEZ, P. M. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 133-137, jan./mar., 2010.

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H.; SANTIAGO, L. B.; OLIVEIRA, E. L. de; SOUSA, A. L. M.; ALVES, F. S. F.; CRUZ, J. C. M. da. **Lentivirose em pequenos ruminantes: principais métodos de diagnóstico.** Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2012. 42 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 107).

RODRIGUES, A. S.; PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L.; ANDRIOLI, A.; OLIVEIRA, L. S.; SIDER, L. H.; SANTOS, V. W.; OLIVEIRA, E. L. de; DIAS, R. P.; GOUVEIA, A. M. G.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação de um controle estratégico da artrite encefalite caprina em rebanho caprino leiteiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 139-146, 2018.

TESORO-CRUZ, E.; FERIA-ROMERO, I. A.; OROZCO-SUÁREZ, S.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R.; SILVA-GARCÍA, R.; VALLADARES-SALGADO, A.; BEKKER-MÉNDEZ, V. C.; BLANCO-FAVELA, F.; AGUILAR-SETIÉN A. Frequency of the serological reactivity against the caprine arthritis encephalitis lentivirus gp135 in children who consume goat milk. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 3, p. 204-207, Apr. 2009. DOI: 10.1016/j.arcmed.2009.02.002.

TYLER, J. W.; CULLOR, J. S. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 11, p. 1550-1558, Jun. 1989.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos
Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/
Goiatins, Km 4 Caixa Postal: 71
CEP: 62010-970 - Sobral, CE
Fone: (88) 3112-7400
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
On-line (2019)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações da Embrapa
Caprinos e Ovinos

Presidente
Cícero Cartaxo de Lucena

Secretário-Executivo
Alexandre César Silva Marinho

Membros
Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Carlos José Mendes Vasconcelos, Fábio Mendonça Diniz, Maíra Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Marcos André Cordeiro Lopes, Tânia Maria Chaves Campêlo, Zenildo Ferreira Holanda Filho

Supervisão editorial
Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto
Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica
Tânia Maria Chaves Campêlo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Francisco Felipe Nascimento Mendes

Foto da capa
Alice Andrioli Pinheiro

CGPE 15485