

# APLICAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA D DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EXPRESSA EM *Pichia pastoris* COMO ANTÍGENO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO POR ELISA INDIRETO

DUMMER, L. A.<sup>1\*</sup>; ROOS, T. B.<sup>2</sup>; MORAES, C. M.<sup>1</sup>; ROCHA, A. S. R.<sup>1</sup>;  
NIZOLI, L. Q.<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, F. R.<sup>3</sup>; VIDOR, T.<sup>4</sup>; LEITE, F. P. L.<sup>4,5</sup>

## INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com um plantel de 207,2 milhões de cabeças em 2007, e atualmente destaca-se como o maior exportador mundial de carne bovina (SANTOS et al., 2007). Apesar disso, o país ainda possui grandes perdas econômicas relacionadas a doenças que atingem rebanhos e que podem prejudicar o ganho de peso, índices reprodutivos ou até mesmo ocasionar a perda dos animais.

O Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente responsável por neuropatias que contribuem para as perdas econômicas dos produtores brasileiros. Surtos fatais de meningoencefalites são descritos em todo o mundo, no entanto, a maior incidência ocorre principalmente na Argentina e no Brasil, onde já foi relatado nos Estados que possuem rebanhos (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; GOMES et al., 2002). Descrito pela primeira vez na Austrália em 1962 (FRENCH, 1962), o BoHV-5 foi inicialmente classificado como uma variante neuropatogênica do BoHV-1, agente da Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina e de Vulvovaginite devido as suas propriedades biológicas, morfológicas e antigênicas. No entanto, estudos moleculares e imunológicos, baseados em mapas de sítios de restrição de DNA viral, reações cruzadas em testes de neutralização e reatividade de anticorpos monoclonais, demonstraram que ambos os vírus compartilham 85% de identidade no DNA genômico, mas possuem propriedades antigênicas distintas, sendo que em 1992, o BoHV-5 foi reconhecido como um vírus distinto (ROIZMAN et al., 1992).

Apesar destas diferenças, técnicas sorológicas de rotina são incapazes de distinguir infecções do BoHV-1 e do BoHV-5, pois ambos apresentam reações de neutralização cruzada. Isso pode ser demonstrado na baixa incidência do BoHV-5 em países onde há um histórico prolongado de programas de vacinações contra o BoHV-1 (VOGEL et al., 2002). O diagnóstico laboratorial de infecções agudas pelo BoHV-1 e BoHV-5 é geralmente realizado através de testes sorológicos pareados, como a soro neutralização e o ELISA. No entanto, as reações de soro neutralizações demandam tempo e profissionais qualificados para o manuseio de vírus e células de cultivo, além de ser uma técnica relativamente cara. Os testes de ELISA, por serem mais

---

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação Biotecnologia Agrícola, UFPel;

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação Medicina Veterinária, UFPel;

<sup>3</sup> Centro de Biotecnologia, UFPel;

<sup>4</sup> Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPel;

<sup>5</sup> Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFPel;

rápidos, permitem uma triagem de rebanho, distinguindo animais portadores de anticorpos anti-BoHV-1 ou 5 dos não portadores.

As glicoproteínas presentes no envelope dos BoHV 1 e 5 são alvos de estudos visando não apenas a produção de vacinas de subunidade, como também o emprego destas em testes sorológicos rápidos para o diagnóstico das infecções causadas por estes vírus. Dentre as glicoproteínas que se destacam pela capacidade de estimular anticorpos neutralizantes no hospedeiro está a glicoproteína D. Esta glicoproteína de 417 aminoácidos é codificada pela família de genes alpha, a qual possui a sua transcrição imediata no hospedeiro, estando presente nas etapas iniciais da infecção e, portanto, tornando-se um dos alvos primários das reações de defesa do organismo infectado (ABDELMAGID et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi demonstrar a aplicação a glicoproteína D expressa de forma truncada na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* como antígeno para a triagem sorológica por ELISA.

## METODOLOGIA

Herpesvírus bovino tipo 5 (Strain 507/99) foram propagados em células *Madin Darby Kidney Cells* (MDBK, ATCC CCL22) cultivadas em Meio Mínimo de Eagle (MEM) suplementado com antibióticos (200 I.U./ml de Estreptomicina e Penicilina; 5 µg/ml de Enrofloxacin e 2,5 µg/ml de Anfotericina B) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), a 37°C em câmara de 5% de CO<sub>2</sub> até a obtenção de 90% de Efeito Citopático visível no tapete celular.

O DNA viral foi obtido através da utilização de *TRIzol reagent* (Invitrogen) de acordo com o protocolo do produto. A reação de amplificação do DNA por PCR foi preparada com aproximadamente 25ng de DNA (2µl) e 23µl de uma solução Mix com o restante dos reagentes acrescido de 2% de DMSO. Os primers foram desenhados visando à expressão da glicoproteína D sem as regiões transmembrana e citoplasmática. Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado com *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e, juntamente com o vetor de expressão pPICZαB, digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI* e unidos com enzima T4 ligase. O plasmídeo resultante (pPICZαB/tgDBoHV-5) foi transformado em *E. coli* cepa TOP10 F por eletroporação e a seleção foi realizada em placas de LB por resistência a Zeocina (25µg/ml) e através da extração de plasmídeo pelo método descrito por Jouglard et al. 2006. Após a escolha de um clone recombinante foi realizada a propagação e a extração do plasmídeo, o qual foi linearizado com a enzima de restrição *PmeI*.

A transformação da levedura *Pichia pastoris* cepa KM71H fenótipo Mut<sup>S</sup> foi realizada por eletroporação e então semeada em placas YPDS acrescidas de 100-g/ml de Zeocina e incubadas por 3 dias a 28°C. Os clones resistentes ao antibiótico foram novamente repicados para placas BMMY e incubados a 28°C por 3 dias, durante os quais foi adicionado 1% de metanol na tampa das

placas, a cada 24 h. Desta forma, realizou-se o teste de Colony Blotting conforme previamente descrito por Goodnough et al. 1993. Os clones recombinantes expressando a *tgD* foram selecionados com MAb Anti 6xHIS. Após a escolha de um clone recombinante de *P. pastoris*, foi realizada a indução da expressão em fermentador em meio BMMY a 28°C durante 5 dias, no quais com 1% de metanol adicionado a cada 24 h, conforme descrito previamente (DUMMER, L. A. *et al.* Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine Herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Artigo submetido ao Journal of Virological Methods em junho 2008). Ao término do 5º dia de indução, o sobrenadante resultante do cultivo das células de levedura foi então submetido à precipitação protéica através de gradiente de Sulfato de Amônio. A remoção do sal foi realizada por diálise em PBS-T. A confirmação da expressão foi realizada através de gel 12% de SDS-PAGE e Western-Blotting, utilizando MAb Anti-6xHIS e anticorpos policlonais de animais imunizados com BoHV-1 e BoHV-5.

O ELISA foi realizado com soros de bovinos imunizados com BoHV-5, oriundos do Laboratório de Virologia e Imunologia Animal da Faculdade de Veterinária da UFPEL. Para a sensibilização das placas de ELISA, utilizaram-se três diferentes diluições da *tgD* (100, 200 e 400ng/100µl). Os soros foram utilizados como um pool de 10 soros negativos e positivos, em diluições 1:200 e 1:400, e também da forma individualizada, com soros negativos sendo considerados como < de 1:4 no teste de soro neutralização e com os positivos sendo considerados como > 1:32 no mesmo teste. Após a sensibilização da placa com a proteína, foi realizado bloqueio com leite desnatado 0,5% e o ELISA foi revelado com MAb Anti IgG Bovino 1:4. 000. Como controle negativo foi utilizado Soro Fetal Bovino e como controle positivo, soro hiperimune de bovinos imunizados com BoHV-1 e BoHV-5. Todos os soros foram utilizados em triplicatas e os resultados da Densidade Óptica obtidos foram avaliados pelas médias da triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto de PCR resultante da amplificação do gene da glicoproteína D demonstrou ter o tamanho esperado (956bp) após a eletroforese em gel de Agarose 0.8%. O vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZαB/*tgD* utilizado na transformação de *E. coli* resultou em diversas colônias resistentes a Zeocina, e 15 destas foram submetidas ao método de extração de plasmídeo descrito por Jouglard et al, 2006, o qual demonstrou 12 colônias recombinantes, confirmadas também por PCR utilizando o mesmo set de primers previamente utilizado. Um destes clones foi então selecionado, propagado e linearizado para a transformação em *P. pastoris*, obtendo-se diversas colônias resistentes a Zeocina e que foram submetidas ao teste de Colony Blotting. Um clone com expressão positiva a este teste foi selecionado para a expressão da proteína recombinante em fermentador. Após 5 dias, o sobrenadante foi precipitado com

70% de Sulfato de Amônio, o qual demonstrou ser o melhor nível de saturação para a precipitação da glicoproteína D do meio de cultivo. A precipitação com Sulfato de Amônio é um método simplificado que permite a obtenção da proteína purificada em uma única etapa. A quantificação da proteína obtida demonstrou a secreção para o sobrenadante de ~190mg/L. A tgD obtida apresentou o tamanho esperado em SDS-PAGE e foi reconhecida pelo MAb Anti-6xHIS, utilizado no Western-blotting. Os soros de animais imunizados com BoHV-1 e BoHV-5 utilizados no preparo de Western-blotting também reconheceram a glicoproteína recombinante, sugerindo a manutenção de características da glicoproteína D de BoHV-5 nativa.

As leituras obtidas no ELISA utilizando a tgD para a sensibilização da placa em diferentes concentrações (100, 200 e 400ng) demonstrou diferenças significativas na D.O. entre os soros considerados positivos e negativos para a soro neutralização. A variação obtida foi de 3 a 6 vezes, dependendo da concentração utilizada, sendo que a variação mais significativa foi obtida com a sensibilização da placa com 200ng da glicoproteína recombinante. Os soros em pool foram utilizados nas diluições 1:200 e 1:400, e a diluição que permitiu uma maior variação foi a 1:400, quando a placa foi bloqueada com 0,5% de leite desnatado. Nesta concentração da proteína e diluição dos soros foi possível detectar uma diferença na D.O. entre positivos e negativos de até 6.2 vezes, o que pode ser considerado como uma diferença significativa para a determinação da presença de animais positivos e negativos em um rebanho (Fig.1). Os soros foram também testados individualmente, na diluição 1:400, utilizando 200ng para a sensibilização das placas. As médias das triplicatas dos soros positivos comparadas com as médias dos soros negativos demonstraram uma diferença significativa quando analisadas pelo teste de  $t$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). Os soros dos controles positivos de animais imunizados com BoHV-1 e BoHV-5 demonstraram leituras da D.O semelhantes, no entanto, valores maiores foram encontrados nas leituras do BoHV-1. Apesar de a glicoproteína recombinante utilizada ser do BoHV-5, as gD de ambos os vírus são homologas. Este resultado demonstra que apesar de não diferenciar a presença de BoHV-1 ou BoHV-5 no rebanho, a utilização da tgD expressa em *P. pastoris* pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico rápido quando utilizada em ELISA indireto, permitindo uma triagem de uma grande população de animais, uma vez que, comparada a técnica de neutralização, o ELISA é mais simples, rápido e segura, uma vez que não necessita a manipulação de vírus ou cultivos celulares. Portanto, o presente trabalho demonstrou a possibilidade de aplicação da tgD em ELISA indireto para o diagnóstico de BoHV-1 e 5. Entretanto, é necessário que um maior número de amostras seja analisado para que a técnica seja validada.

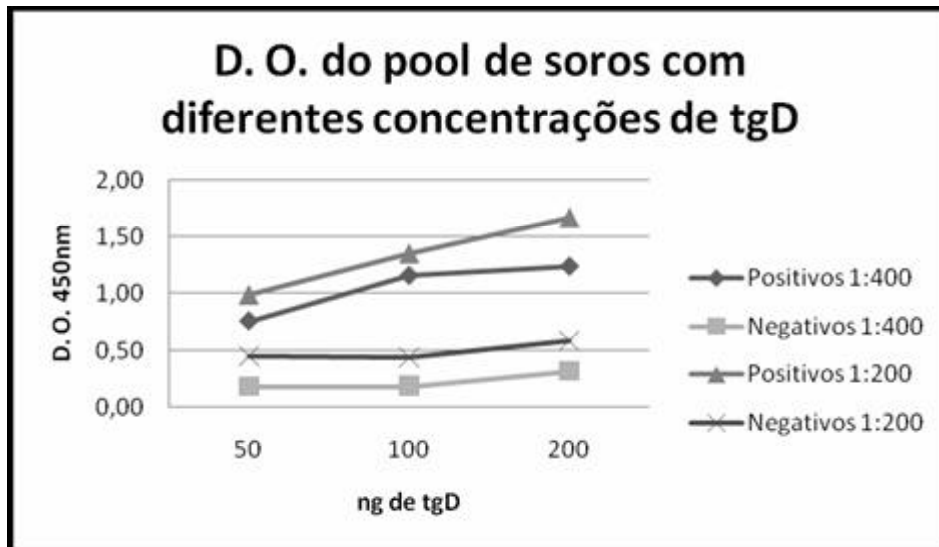


Figura 1. ELISA indireto utilizando diferentes concentrações de tgD. Leitura da D. O. do pool de soros positivos e negativos na técnica de soro neutralização em duas diluições (1:200 e 1:400). As leituras demonstraram diferenças significativas entre positivos e negativos, chegando a 6,02 vezes quando a concentração protéica foi 200ng e os soros diluídos 1:400

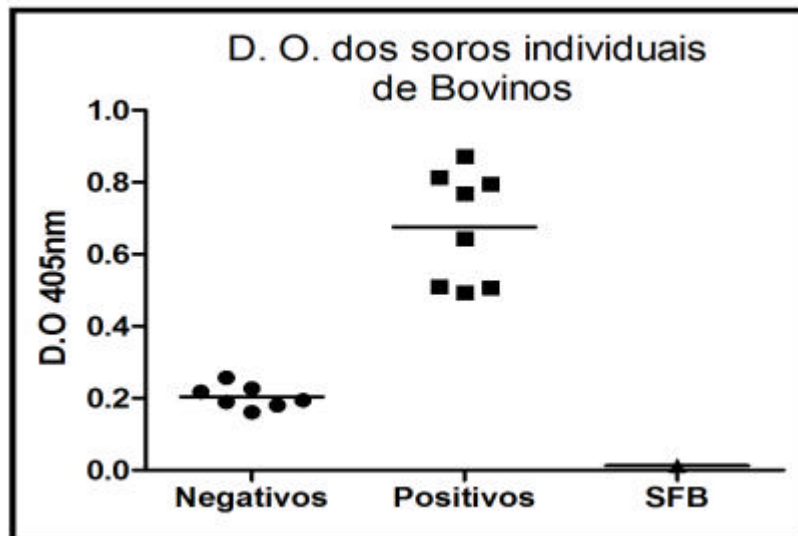


Figura 2. ELISA indireto utilizando soros individuais de bovinos que obtiveram diagnóstico negativo ou positivo na técnica de soro neutralização. As leituras das médias dos soros positivos demonstraram diferença significativa comparadas com soros negativos ( $p < 0,05$ ). Controle negativo utilizando soro fetal bovino (SFB).

## REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS

ABDELMAGID, O.Y.; MINOCHA, H.C.; COLLINS, J.K.; CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. **Virology**, v. 206, p. 242-253, 1995.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P. da; SOUZA, M. de A.; FILHO, J.A. de O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por Herpesvírus Bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.

FRENCH, E.L.A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization on the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221, 1962.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detecção de Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 217-220, 2002

GOODNOUGH, M.C., HAMMER, B., SUGIYAMA, H., JOHNSON, E.A., Colony immunoblot assay of botulinal toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, 2339-2342, 1993.

JOUGLARD, S.D., MEDEIROS, M.A., VAZ, E.K., BASTOS, R.G., CUNHA, C.W., ARMOA, G.R.G., DELLAGOSTIN, O.A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. Abstr. **Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.** H71, 234. 2006.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, 1992.

SANTOS, C.; REETZ, E.R.; BELING, R.R.; VENCATO, A.; RIGON, L.; CORRÊA, S. **Anuário Brasileiro da pecuária 2007**, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2007. 128p.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSORIO, A.L.A.R. Meningoencefalite em bovinos causada por Herpesvírus Bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 75-82, 1998.

VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C.F. Atividade neutralizante anti-Herpesvírus Bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 881-883, 2002.