

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES  
SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO  
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) UTILIZANDO  
ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

SUELI AKEMI TANIWAKI

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES  
SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO  
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) UTILIZANDO  
ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

SUELI AKEMI TANIWAKI

Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr.

BOTUCATU – SP  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Taniwaki, Sueli Akemi.

Desenvolvimento e validação de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) utilizando antígenos recombinantes / Sueli Akemi Taniwaki. – Botucatu, 2013

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Capes: 50501062

1. Teste imunoenzimático. 2. Felídeo. 3. Síndromes da deficiência imunológica - Diagnóstico. 4. Sorologia. 5. Antígenos. 6. HIV (Vírus) – Modelos animais.

Palavras-chave: Antígenos recombinantes; ELISA indireto; Vírus da imunodeficiência felina; Western blot.

Nome do Autor: Sueli Akemi Taniwaki

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS  
PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA  
FELINA (FIV) UTILIZANDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr.

Presidente e Orientador

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Valéria Maria Lara Carregaro

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Universidade Camilo Castelo Branco-UNICASTELO - Campus Descalvado

Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto

Membro

Departamento de Clínicas Veterinárias

Centro de Ciências Agrárias - Universidade Estadual de Londrina

Data da Defesa: 12 de dezembro de 2012.

*“Dedico esta tese ao meu  
marido, que está ao meu lado  
sempre me lembrando que o  
amor supera tudo.”*

## **Agradecimentos**

*O tempo passa tão rápido e tão devagar ao mesmo tempo... Em alguns momentos achamos que o tempo não passa, pois queremos o quanto antes ficar ao lado da pessoa amada a parece que esse dia não chega nunca. Mas quando vimos um, dois, três anos já se passaram e enfim é o momento de finalizar mais uma etapa de nossas vidas.*

*Nessa longa caminhada, muitas pessoas passaram por minha vida e todas de uma forma ou de outra me ajudaram a me tornar o que sou hoje. Assim, seria injusto não agradecer a todos pelo apoio e carinho que me ofereceram. Por isso, antes de tudo e para não esquecer ninguém, agradeço sinceramente a todos que fizeram possível a realização desse importante passo na minha vida e me ajudaram a trilhar por caminhos cheio de espinhos.*

*À Deus agradeço por iluminar sempre meu caminho e colocar pessoas especiais ao meu lado. Pelos momentos de fé, paz e esperança que me ajudaram a superar momentos de desespero.*

*À toda minha família pela dedicação e apoio incondicional. Ao meu pai que nunca questionou minhas decisões e sempre me incentivou a estudar. E, à minha mãe por simplesmente estar ao meu lado, sem cobranças, mesmo quando não presto atenção no que está dizendo ou esqueço que é época de consulta. Por cuidar dos meus gatos e cachorros, que realmente dão muito trabalho, mas também muita alegria.*

*À minha irmã Susana pelos momentos de conversa e por sempre cuidar de mim. Ao meu sobrinho Daniel por alegrar a nossa vida e ser um grande companheiro para minha mãe. À minha cunhada Karen e aos meus cunhados Breno e Beto pelo carinho e amizade.*

*À minha irmã Pâmela por cuidar do meu pai.*

*Aos meus amigos Rosana, Arnaldo (Boia), Milton, Tati, Márcio, Kaori, Núbia, Ricardo (KK), Leandro, Ângela e Júlio pela companhia.*

*Ao meu orientador João Pessoa que plantou uma sementinha ao me iniciar na vida científica e despertou a vontade de me tornar pesquisadora. Muito obrigada por todo o apoio durante o desenvolvimento do projeto, mas acima de tudo por sempre estar disponível (apesar da fila na frente da sua sala) e ser mais que um simples orientador e sim um amigo. Por sempre estar com as portas abertas às sugestões e qualquer loucura que decidimos inventar... Por acreditar sempre no meu potencial e ser um exemplo a ser seguido.*

*Aos meus companheiros de laboratório pelo conforto e alegria, mesmo quando as coisas teimam em dar errado.*

*À Tais por me aguentar tanto tempo tirando o seu sossego em sua casa e também por todos os seus ensinamentos, incluindo a persistência e dedicação.*

*À Andreza pelos momentos de diversão e longos debates sobre os projetos e essa vida de pesquisador...*

*Taís e Andreza muito obrigada, pois sem a amizade e todo o apoio nos momentos difíceis jamais teria finalizado o doutorado. Mesmo de longe estarei sempre torcendo por vocês.*

*À Jacque, Ricardo (Curan) e Mari pelos momentos de descontração que sempre ajudam a esfriar a cabeça e tornar melhor o convívio no lab.*

*A todos os outros colegas (Cláudia, Ariani, Vivian, Lidiany, Michely, Eduardo (Duroc), Vanessa) assim como muitos estagiários que passaram no laboratório, pela amizade.*

*Muito obrigada aos meus queridos estagiários que passaram a ser meus amigos: Tati, Marlous (Uai) e Elaine (Ploc), que além de toda a ajuda nas tarefas, me ajudaram a crescer, pois é essencial aprender a ensinar e formar um profissional. Estou muito feliz por ter participado da formação de vocês.*

*O meu trabalho não seria possível sem a ajuda de muitas pessoas, uma vez que utilizei laboratórios de outros departamentos e faculdades.*

*Passei um bom tempo no VPS da FMVZ USP, portanto gostaria de agradecer aos Profs. Leonardo Ritzeinhain e Paulo Brandão por abrir as portas dos seus laboratórios e disponibilizar todos os seus equipamentos, assim como seus conhecimentos. Às “meninas da USP” (Aline, Cíntia, Alessandra, Sueli, Carol, Gi, Sheila e todas as outras) pelo companheirismo e atenção.*

*Ao Prof. Marcos Fontes e seus alunos Carlos e Agnes do departamento de Biofísica que possibilitaram as análises no DLS.*

*Ao Prof. Valber A. Pedrosa do departamento de Química, assim como o Prof. Valtencir Zucolotto do Instituto de Física de São Carlos (USP) pela ajuda com a análise do ouro coloidal.*

*Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica (Lígia, Claudete, Rodrigo e Tiago) pela ajuda nas análises das nanopartículas de ouro.*

*À Profa. Mitika Hagiwara e à sua aluna Aline (agora no doutorado) por ceder as amostras que possibilitaram a validação da técnica de ELISA.*

*Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia que sempre estavam dispostos a ajudar e que com certeza tornaram mais agradável a dura vida de pós-graduanda.*

*Em especial agradeço à Profa. Terue pelas conversas, brincadeiras e sua amizade.*

*Também gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado (2009/52979-5) e pelo auxílio ao projeto, pois seria impossível o desenvolvimento do trabalho sem ele.*

*E finalmente, agradeço ao meu marido e melhor amigo Eric por me amar e tornar possível esse casamento à distância. Pelas palavras que a princípio parecem duras: “Quem escolheu essa vida foi você”... mas nada mais que a verdade... Por me lembrar que se eu decidi entrar no doutorado é porque gosto da pesquisa e sou capaz de superar as dificuldades.*

*Por estar ao meu lado sempre, mesmo quando pessoas tentam abalar o nosso casamento perfeito, pois “nós somos o melhor casal do mundo”.*

*Muito obrigada por acreditar em mim mais do que todos.*

*Por transformar a paixão em amor e companheirismo.*

*Nenhuma conquista profissional seria gratificante se minha vida pessoal não estivesse crescendo junto.*

*Muito obrigada a todos!*

*Sú*

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1: <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas de capsídeo (p24) e matriz (p17) do FIV.....                                                      | 15 |
| TABELA 2: Comparação da quantidade de número de moléculas em relação massa (ng/poço) de cada antígeno .....                                                                                     | 34 |
| TABELA 3: Valores de identidade de aminoácidos das proteínas recombinantes do FIV em comparação com isolados de referência. ....                                                                | 50 |
| TABELA 4: Comparação dos protocolos de ELISA indireto convencional e rápido. ....                                                                                                               | 63 |
| TABELA 5: Comparação entre os resultados do SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test e o ELISA indireto com os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM, com valores em absorvância. ....  | 64 |
| TABELA 6: Comparação entre os resultados do SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test e o ELISA indireto com os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM, com valores em índice ELISA. .... | 64 |
| TABELA 7: Valores de ponto de corte utilizados para reação com cada antígeno recombinante e valores em absorvância das amostras positivas.....                                                  | 65 |
| TABELA 8: Resultados do SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test e o ELISA indireto com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e FIV-TM. ....                                                  | 78 |

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                                                     |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1:  | Estrutura do vírus da imunodeficiência felina..                                                                                     | 2  |
| FIGURA 2:  | Organização do genoma proviral do Vírus da Imunodeficiência Felina.....                                                             | 3  |
| FIGURA 3:  | Ocorrência da infecção pelo FIV no Brasil. ....                                                                                     | 4  |
| FIGURA 4:  | Patogenia da infecção pelo FIV.....                                                                                                 | 5  |
| FIGURA 5:  | Mapa e pontos de referência da seqüência do plasmídeo pGEM®-T Easy Vector.....                                                      | 19 |
| FIGURA 6:  | Mapa e pontos de referência da seqüência do plasmídeo pET 28a. ....                                                                 | 19 |
| FIGURA 7:  | Amplificação do fragmento de DNA que codifica o antígeno de capsídeo (FIVp24 BamHI/HindIII).....                                    | 43 |
| FIGURA 8:  | Amplificação do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII.. ....                                                                               | 44 |
| FIGURA 9:  | Amplificação do fragmento FIVp24 NcoI/HindIII.. ....                                                                                | 45 |
| FIGURA 10: | Amplificação do fragmento FIVp17 NcoI/HindIII.. ....                                                                                | 45 |
| FIGURA 11: | PCR das colônias para seleção dos clones pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII. ....                                                            | 46 |
| FIGURA 12: | Digestão do plasmídeo pET28a e plasmídeo recombinante pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III..... | 47 |
| FIGURA 13: | PCR da reação de ligação do plasmídeo pET28a e do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII.....                                               | 47 |
| FIGURA 14: | PCR das colônias para seleção dos clones pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII. ....                                                          | 48 |
| FIGURA 15: | PCR da reação de ligação do plasmídeo pET28a e do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII.....                                               | 48 |
| FIGURA 16: | PCR das colônias para seleção dos clones pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII .....                                                          | 49 |
| FIGURA 17: | PCR das colônias para seleção dos clones pET-FIVp24 NcoI/HindIII.....                                                               | 49 |
| FIGURA 18: | PCR das colônias para seleção dos clones pET-FIVp17 NcoI/HindIII.....                                                               | 50 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 19: SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação da cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII após indução.....   | 52 |
| FIGURA 20: SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação da cultura pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII após indução .....  | 52 |
| FIGURA 21: SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação após indução da cultura pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII.. ..... | 53 |
| FIGURA 22: SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação após indução da cultura pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII .....   | 53 |
| FIGURA 23: SDS-PAGE da determinação da solubilidade da proteína FIVp24N'.. .....                                     | 54 |
| FIGURA 24: SDS-PAGE da determinação da solubilidade da proteína FIVp17N'.. .....                                     | 54 |
| FIGURA 25: Resultado do ELISA indireto para teste de antigenicidade das proteínas FIVp24C' e FIVp17C' .....          | 56 |
| FIGURA 26: Resultado do ELISA indireto para teste de antigenicidade das proteínas FIVp24N' e FIVp17N'.....           | 56 |
| FIGURA 27: SDS-PAGE após purificação da proteína FIVp17N' .....                                                      | 57 |
| FIGURA 28: SDS-PAGE após purificação da proteína FIVp24N' .....                                                      | 57 |
| FIGURA 29: SDS-PAGE após purificação das proteínas FIVp17C' e FIVp24C'.. .....                                       | 58 |
| FIGURA 30: Western blot para confirmar a especificidade dos antígenos FIVp17N' e FIVp24N'.....                       | 59 |
| FIGURA 31: Western blot para confirmar a especificidade dos antígenos FIVp17C' e FIVp24C'.....                       | 59 |
| FIGURA 32: Determinação da concentração ideal dos antígenos FIVp17N', FIVp24N' e FIV-TM.....                         | 60 |
| FIGURA 33: Determinação da concentração ideal dos antígenos FIVp17C' e FIVp24C' .....                                | 60 |
| FIGURA 34: Resultado do ELISA indireto rápido com conjugado diluído 1/1000 (A) e 1/500 (B) .....                     | 62 |
| FIGURA 35: Resultado do ELISA indireto rápido com a concentração de antígenos em número de moléculas por poço.....   | 62 |
| FIGURA 36: Titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato .....                                                         | 65 |

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 37: Armazenamento das tiras de ELISA com IgG anti-IgG de gato sem conservantes..                                                                            | 66  |
| FIGURA 38: Tempo de manutenção da reatividade dos antígenos FIVp24/TM e Anti-IgG gato sem (A) e com (B) o uso de inibidor de protease no bloqueio.....             | 67  |
| FIGURA 39: Coeficiente de variação intra-teste .....                                                                                                               | 68  |
| FIGURA 40: Coeficiente de variação inter-teste .....                                                                                                               | 68  |
| FIGURA 41: SDS-PAGE das frações 9 a 24 após purificação da proteína FIVp24/TM.....                                                                                 | 70  |
| FIGURA 42: SDS-PAGE das frações 25 a 31 após purificação da proteína FIVp24/TM (2)..                                                                               | 70  |
| FIGURA 43: Western blot para confirmar a especificidade do antígeno FIVp24/TM.....                                                                                 | 71  |
| FIGURA 44: SDS-PAGE com Tris-Glicina da proteína FIVp17C' ..                                                                                                       | 72  |
| FIGURA 45: SDS-PAGE com Tris-Glicina das proteínas FIVp24C' e FIVp24N' ..                                                                                          | 72  |
| FIGURA 46: SDS-PAGE com Tris-Glicina do peptídeo FIV-TM .....                                                                                                      | 73  |
| FIGURA 47: SDS-PAGE com Tris-Tricina (16%) das proteínas FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM.....                                                      | 74  |
| FIGURA 48: SDS-PAGE com Tris-Tricina (16% com ureia) das proteínas FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM .....                                           | 74  |
| FIGURA 49: SDS-PAGE e Western blot com os antígenos FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM.....                                                                      | 76  |
| FIGURA 50: Western blot com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM à partir do gel de Tris-Tricina a 16% sem ureia (A) e com ureia (B) ..... | 76  |
| FIGURA 51: Western blot com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM.....                                                                      | 77  |
| FIGURA 52: Western blot das amostras com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM.....                                                         | 778 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

-: negativo  
+: positivo  
°C: graus Celsius  
µg: micrograma  
µL: microlitro  
µm: micrômetro  
µM: micromolar  
6xHis: cauda com 6 histidinas  
A<sub>450</sub>: absorvância a 450 nm  
A<sub>600</sub>: absorvância a 600 nm  
AEBSF: 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride  
AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
BCA: ácido bicinconínico  
bp: base pairs (pares de base)  
BSA: Albumina sérica bovina  
C': carboxi  
CA: região codificadora da proteína de capsídeo  
CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio  
cm:centimetro  
CRFK: *Crandell Rees feline kidney*  
CV: coeficiente de variação  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)  
dNTP: desoxibonucleotídeos trifosfatados  
DP: desvio padrão  
DU: região codificadora da dUTPase  
dUTPase: dUTP (desoxiuridina trifosfato) pirofosfatase  
E-64: *trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane  
E. coli: *Escherichia coli*  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
EIAV: *Equine Infectious Anemia Virus* (Vírus da anemia infecciosa dos eqüinos)  
ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent assay*  
env: envelope  
EUA: Estados Unidos da América  
FeLV: *Feline Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência felina)  
FIV: *Feline Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Felina)  
g: grama  
gag: antígeno grupo específico  
gp36/40 ou gp41: glicoproteína transmembrana  
gp95: glicoproteína de superfície  
gp130: precursor gp40 e gp95

h: hora  
HCl: cloreto de hidrogênio  
HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)  
IFA: teste de imunofluorescência  
IgG: imunoglobulina G  
IN: região codificadora da integrase  
IPTG: isopropil1 $\beta$ -tiogalactopiranosídeo  
kb: kilobase  
KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: acetado de potássio  
KCl: cloreto de potássio  
kDA: kilodalton  
L: litro  
LB: Luria-Bertani  
LDM: Laboratório de Diagnóstico Molecular  
LPD: leite em pó desnatado  
LTRs: *Long terminal repeats*  
MA: região codificadora da proteína de matriz  
mg: miligrama  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
máx.: máxima  
méd.: média  
mín.: mínima  
min: minuto  
mL: mililitro  
mM: milimolar  
MnCl<sub>2</sub>: cloreto de manganês  
N: Normal  
N': amino  
NaCl: cloreto de sódio  
NaMOPS: 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (acertar pH com NaOH)  
NaOH: hidróxido de sódio  
NC: região codificadora da proteína de nucleocapsídeo  
NH<sub>4</sub>OH: hidróxido de amônio  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de amônio  
ng: nanograma  
nm: nanômetro  
p7 ou p10: proteína de nucleocapsídeo  
p13: protease  
p14: dUTPase  
p15 ou p17: proteína de matriz  
p24: proteína de capsídeo  
p24/TM: proteína de capsídeo fundida ao epitopo transmembrana  
p31: integrase  
p55: precursor proteínas do gene gag

p66/51: transcriptase reversa  
PBS: tampão fosfato (*Phosphate buffered saline*)  
PBSTL: PBS + 0,05%Tween20 + 10%LPD  
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)  
pH: potencial hidrogeniônico  
p.i.: pós-infecção  
pmol: picomol  
PMSF: *phenylmethanesulphonylfluoride*  
 $\text{PO}_4^{--}$ : fosfato  
pol: polimerase  
PR: região codificadora da protease  
RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)  
rpm: rotações por minuto  
RT: região codificadora da transcriptase reversa  
SDS: Sódio dodecil-sulfato  
SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
seg: segundo  
SIV: *Simian Immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência dos símios)  
SU: região codificadora da proteína de superfície  
TBSL: TBS com 10% de leite em pó desnatado  
TBS: *Tris-Buffered saline*  
TCB: tampão carbonato-bicarbonato  
TM: transmembrana  
TMB: tetrametilbenzadina  
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane  
U: unidade  
V: volts  
WB: *Western Blotting*  
x g: RCF (força centrífuga relativa)  
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo  
 $\bar{x}$  : média

## SUMÁRIO

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                       | 1  |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                            | 2  |
| 2.1. Infecção pelo vírus da imunodeficiência felina.....                                                                  | 2  |
| 2.2. Diagnóstico da infecção pelo FIV .....                                                                               | 6  |
| 2.2.2. Diagnóstico direto .....                                                                                           | 6  |
| 2.2.2. Diagnóstico indireto .....                                                                                         | 6  |
| 2.3. ELISA.....                                                                                                           | 7  |
| 2.3.1. ELISA com antígenos virais recombinantes .....                                                                     | 8  |
| 2.3.2. Antígenos recombinantes utilizados no diagnóstico da<br>infecção pelo FIV .....                                    | 8  |
| 2.4. WESTERN BLOT.....                                                                                                    | 10 |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                                                        | 12 |
| 3.1. Objetivo geral.....                                                                                                  | 12 |
| 3.2. Objetivos específicos .....                                                                                          | 12 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                               | 13 |
| 4.1. Etapas da pesquisa .....                                                                                             | 13 |
| 4.2. Amostras.....                                                                                                        | 14 |
| 4.3. Extração de DNA .....                                                                                                | 14 |
| 4.4. Amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e<br>p17 do FIV .....                                     | 14 |
| 4.4.1. Oligonucleotídeos iniciadores.....                                                                                 | 14 |
| 4.4.2. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do<br>FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal ..... | 16 |
| 4.4.3. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do<br>FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal ..... | 16 |
| 4.4.4. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do<br>FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal ..... | 17 |
| 4.4.5. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do<br>FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal ..... | 17 |
| 4.5. Clonagem dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17<br>do FIV .....                                         | 18 |
| 4.5.1. Vetores utilizados na clonagem .....                                                                               | 18 |

|          |                                                                                       |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5.2.   | Preparo e congelamento de células competentes .....                                   | 18 |
| 4.5.3.   | Clonagem do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII .....                                      | 20 |
| 4.5.3.1. | Clonagem inicial no plasmídeo pGEM-T Easy.....                                        | 20 |
| 4.5.3.2. | Subclonagem no vetor de expressão pET 28a.....                                        | 21 |
| 4.5.4.   | Clonagem do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII .....                                      | 22 |
| 4.5.5.   | Clonagem dos fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17<br>NcoI/HindIII .....            | 23 |
| 4.6.     | Sequenciamento .....                                                                  | 24 |
| 4.7.     | Produção das proteínas recombinantes do FIV .....                                     | 25 |
| 4.7.1.   | Determinação do tempo de incubação após indução .....                                 | 26 |
| 4.7.2.   | Determinação da solubilidade das proteínas recombinantes<br>FIVp24N' e FIVp17N' ..... | 26 |
| 4.7.3.   | Determinação da solubilidade das proteínas recombinantes<br>FIVp24C'e FIVp17C' .....  | 27 |
| 4.7.4.   | Teste de antigenicidade das proteínas recombinantes do<br>FIV .....                   | 28 |
| 4.7.5.   | Produção das proteínas recombinantes do FIV para a<br>purificação.....                | 29 |
| 4.8.     | Purificação das proteínas recombinantes do FIV .....                                  | 29 |
| 4.9.     | Especificidade das proteínas recombinantes do FIV .....                               | 30 |
| 4.10.    | ELISA indireto .....                                                                  | 31 |
| 4.10.1.  | Determinação da concentração dos antígenos .....                                      | 31 |
| 4.11.    | Padronização do ELISA indireto rápido .....                                           | 32 |
| 4.11.1.  | Teste inicial com todos os antígenos.....                                             | 33 |
| 4.11.2.  | Teste de concentração de antígeno e diluição do conjugado .....                       | 33 |
| 4.11.3.  | Teste de concentração dos antígenos em número de<br>moléculas.....                    | 33 |
| 4.12.    | ELISA indireto rápido .....                                                           | 34 |
| 4.12.1.  | Processamento das amostras .....                                                      | 34 |
| 4.13.    | ELISA indireto rápido para uso comercial.....                                         | 35 |
| 4.13.1.  | Titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato .....                                     | 35 |
| 4.13.2.  | Armazenamento das microtiras de ELISA .....                                           | 36 |
| 4.14.    | Validação do ELISA indireto rápido com antígeno FIVp24/TM .....                       | 37 |
| 4.14.1.  | Tempo de manutenção da reatividade dos antígenos .....                                | 37 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.14.2. Determinação da repetibilidade do ELISA indireto com antígeno FIVp24/TM .....                                  | 37 |
| 4.15. Padronização do Western blot com proteínas recombinantes do FIV .....                                            | 38 |
| 4.15.1. Produção e purificação da proteína FIVp24/TM .....                                                             | 38 |
| 4.15.2. SDS-PAGE com Tris-Glicina .....                                                                                | 39 |
| 4.15.3. SDS-PAGE com Tris-Tricina.....                                                                                 | 40 |
| 4.15.4. Transferência para a membrana de nitrocelulose.....                                                            | 40 |
| 4.16. Western blot das amostras .....                                                                                  | 41 |
| 5. RESULTADOS .....                                                                                                    | 43 |
| 5.1. Amostras.....                                                                                                     | 43 |
| 5.2. Amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17 do FIV .....                                     | 43 |
| 5.2.1. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal ..... | 43 |
| 5.2.2. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal ..... | 44 |
| 5.2.3. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal ..... | 44 |
| 5.2.4. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal ..... | 45 |
| 5.3. Clonagem dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17 do FIV .....                                         | 46 |
| 5.3.1. Clonagem do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII .....                                                                | 46 |
| 5.3.1.1. Clonagem inicial no plasmídeo pGEM-T Easy.....                                                                | 46 |
| 5.3.1.2. Subclonagem no vetor de expressão pET 28a .....                                                               | 47 |
| 5.3.2. Clonagem do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII .....                                                                | 48 |
| 5.3.3. Clonagem dos fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII .....                                         | 49 |
| 5.4. Sequenciamento .....                                                                                              | 50 |
| 5.5. Produção das proteínas recombinantes do FIV .....                                                                 | 51 |
| 5.5.1. Determinação do tempo de incubação após indução .....                                                           | 51 |
| 5.5.2. Determinação da solubilidade das proteínas recombinantes FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C'e FIVp17C' .....           | 51 |

|                                                                                       |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5.5.3. Teste de antigenicidade das proteínas recombinantes do FIV .....               | 55     |
| 5.6. Purificação das proteínas recombinantes do FIV .....                             | 57     |
| 5.7. Especificidade das proteínas recombinantes do FIV .....                          | 58     |
| 5.8. ELISA indireto .....                                                             | 59     |
| 5.8.1. Determinação da concentração dos antígenos .....                               | 59     |
| 5.9. Padronização do ELISA indireto rápido .....                                      | 61     |
| 5.9.1. Teste inicial com todos os antígenos .....                                     | 61     |
| 5.9.2. Teste de concentração de antígeno e diluição do conjugado .....                | 61     |
| 5.9.3. Teste de concentração dos antígenos em número de moléculas .....               | 61     |
| 5.10. ELISA indireto rápido .....                                                     | 63     |
| 5.10.1. Processamento das amostras .....                                              | 63     |
| 5.11. ELISA indireto rápido para uso comercial .....                                  | 65     |
| 5.11.1. Titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato .....                             | 65     |
| 5.11.2. Armazenamento das microtiras de ELISA .....                                   | 66     |
| 5.12. Validação do ELISA indireto rápido com antígeno FIVp24/TM .....                 | 67     |
| 5.12.1. Tempo de manutenção da reatividade dos antígenos .....                        | 67     |
| 5.12.2. Determinação da repetibilidade do ELISA indireto com antígeno FIVp24/TM ..... | 68     |
| 5.13. Padronização do Western blot com proteínas recombinantes do FIV .....           | 69     |
| 5.13.1. Produção e purificação da proteína FIVp24/TM .....                            | 69     |
| 5.13.2. SDS-PAGE com Tris-Glicina .....                                               | 71     |
| 5.13.3. SDS-PAGE com Tris-Tricina .....                                               | 73     |
| 5.13.4. Transferência para a membrana de nitrocelulose .....                          | 75     |
| 5.14. Western blot das amostras .....                                                 | 77     |
| 6. DISCUSSÃO .....                                                                    | 79     |
| 7. CONCLUSÕES .....                                                                   | 890    |
| 8. REFERÊNCIAS .....                                                                  | 90     |
| 9. TRABALHO CIENTÍFICO .....                                                          | 101101 |

TANIWAKI, S.A. **Desenvolvimento e validação de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) utilizando antígenos recombinantes.** Botucatu, 2012. 139p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) é uma das mais importantes doenças infecciosas dos felinos domésticos. Os gatos infectados apresentam sinais clínicos inespecíficos, portanto para confirmar a infecção são necessários testes laboratoriais específicos. A detecção de anticorpos anti-FIV possui uma correlação direta com a infecção viral, pois uma vez infectado o gato permanece infectado permanentemente. No presente estudo, foram produzidos antígenos recombinantes do capsídeo viral (p24) e proteína de matriz (p17) do FIV. Os fragmentos codificantes da p24 e p17 foram amplificados a partir do DNA pró-viral extraído do sangue periférico de gatos naturalmente infectados pelo FIV (subtipo B), e clonados e expressos em fase com a cauda de histidina (6xHis) na porção amino ou carboxi-terminal. Os antígenos p24, p17, p24 fundido com o epítopo transmembrana (p24/TM) e peptídeo sintético TM do FIV foram utilizados na padronização e aplicação dos testes de ELISA indireto rápido e Western blot para detecção de anticorpos anti-FIV. A reatividade dos antígenos foi analisada separadamente no ELISA indireto rápido, e permitiu a comparação dos antígenos quanto aos valores de sensibilidade e especificidade relativa. O antígeno FIVp24/TM apresentou melhor desempenho, com concordância de 100% com o teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test (n=110). A validação do ELISA indireto rápido com o antígeno FIVp24/TM mostrou características desejáveis para o uso comercial, tais como alta precisão e manutenção da reatividade durante o armazenamento. Pode-se concluir que a produção de antígenos recombinantes do FIV foi eficiente e possibilitou o desenvolvimento de um teste rápido (ELISA indireto rápido) e um teste confirmatório (Western blot) para o diagnóstico da infecção pelo FIV.

**Palavras-chave:** FIV; antígenos recombinantes; ELISA indireto; Western blot.

TANIWAKI, S.A. **Development and validation of serological assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus (FIV) using recombinant antigens.** Botucatu, 2012. 139p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Infection with feline immunodeficiency virus (FIV) is one of the most important infectious diseases of domestic cats. Infected cats exhibit non-specific clinical signs, so specific laboratory assays are necessary to confirm the diagnosis of FIV infection. Detection of anti-FIV antibodies has a direct correlation with the viral infection, because once a cat has been infected it will remain infected permanently. In the present study, we produced FIV recombinant capsid antigen (p24) and matrix protein (p17). The coding fragments of p24 and p17 were obtained from proviral DNA extracted from peripheral blood of cats naturally infected with FIV (subtype B). These fragments were cloned and expressed in phase with amino or carboxi-terminal histidine tag (6xHis). The antigens FIVp24, FIVp17, p24 fused to transmembrane epitope (FIVp24/TM) and synthetic peptide TM were used for standardization and implementation of rapid indirect ELISA and Western blot assays for detection of anti-FIV antibodies. The reactivity of the antigens was analyzed separately in rapid indirect ELISA and allowed the determination of relative sensitivity and specificity of the antigens. The FIVp24/TM antigen has better performance, with 100% of agreement with SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test (IDEXX laboratories). The validation of the FIVp24/TM rapid indirect ELISA showed desirable characteristics for commercial use, such as high precision and maintenance of reactivity during storage. In conclusion, production of FIV recombinant antigens was efficient and allowed the development of a rapid test (rapid indirect ELISA) and a confirmatory test (Western blot) for diagnosis of FIV infection.

**Key words:** FIV; recombinant antigens; indirect ELISA; Western blot.

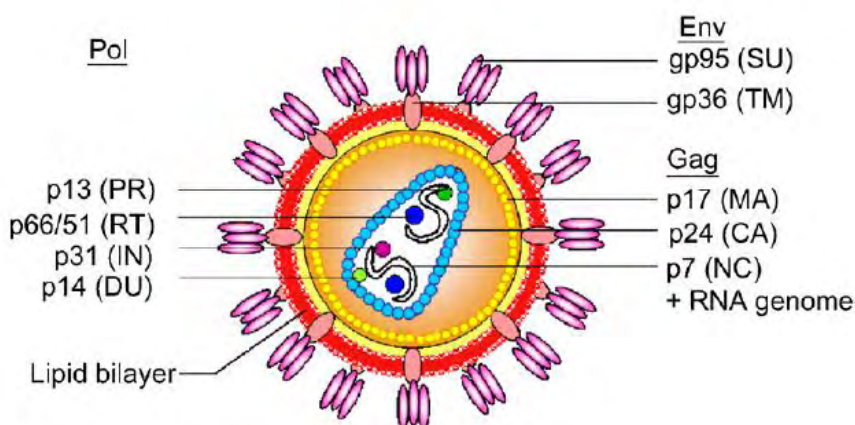
## 1. INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta em 1986, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) tem sido alvo de muitos estudos, pois causa distúrbios imunológicos associados a infecções oportunistas e neoplásicas em gatos domésticos que podem ser fatais. Além disso, se trata de uma doença de difícil diagnóstico clínico, uma vez que o gato pode apresentar uma grande variedade de sinais clínicos inespecíficos, necessitando métodos de diagnósticos laboratoriais específicos. Apesar de vários medicamentos serem testados e utilizados para a diminuição da replicação do vírus, não existe cura para a infecção pelo FIV. Portanto, uma vez infectado pelo FIV, o gato permanece infectado por toda a sua vida. Assim, o diagnóstico pela detecção de anticorpos circulantes possui uma alta correlação com a infecção pelo vírus. As técnicas de ELISA e Western blot para a detecção de anticorpos anti-FIV são utilizadas como testes de triagem e confirmatório, respectivamente. A primeira geração de ELISA usava como antígeno o FIV inteiro inativado, que era obtido a partir de partículas virais de cultura de células. Com o advento das técnicas de DNA recombinante, peptídeos ou proteínas produzidos em sistemas heterólogos (eucariotos ou procariotos) passaram a ser utilizados, possibilitando a detecção de anticorpos contra proteínas virais individuais ou um único epítopo. Vários antígenos recombinantes do FIV têm sido produzidos e testados individualmente ou em associação como reagentes de testes sorológicos, na tentativa de desenvolver um teste com alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, que é essencial para populações onde a prevalência da doença é baixa. No Brasil, o diagnóstico da infecção pelo FIV ainda não é amplamente difundido, principalmente pelo alto custo dos testes específicos, o que dificulta a determinação da real prevalência da doença em nosso país. Portanto, o desenvolvimento de um kit de diagnóstico para infecção pelo FIV é de grande importância para definir um manejo adequado para os gatos infectados, tanto para oferecer uma melhor qualidade de vida, quanto para auxiliar no controle da disseminação do vírus.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Infecção pelo vírus da imunodeficiência felina

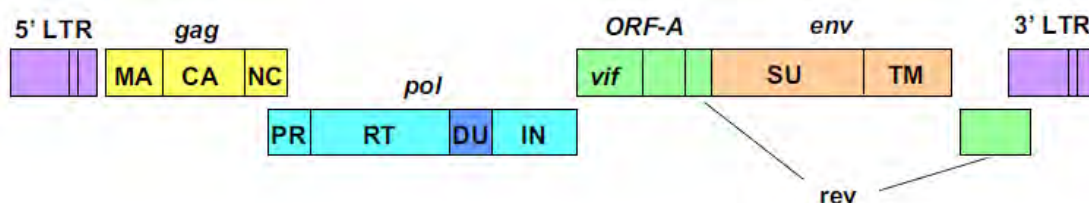
O vírus da imunodeficiência felina (do inglês *Feline Immunodeficiency Virus* - FIV) foi primeiramente isolado de gatos domésticos com sinais de imunodeficiência, porém soronegativos para o vírus da leucemia felina (do inglês *Feline Leukemia vírus* - FeLV), em um criatório no norte da Califórnia, em 1986 (PEDERSEN et al., 1987). O FIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* (ICTVdB, 2006). O vírion apresenta 105-125 nm de diâmetro e contém duas cópias de RNA de fita simples de sentido positivo de aproximadamente 9400 bases e as enzimas transcriptase reversa, deoxiuridina trifosfatase (dUTPase), protease e integrase (Figura 1), que são essenciais para a replicação viral (BENDINELLI et al., 1995; HARTMANN, 1998; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008).



**FIGURA 1:** Estrutura do vírus da imunodeficiência felina. Glicoproteínas do envelope: Superfície (gp95) e Transmembrana (gp36); Proteínas do gene *gag*: Matriz (p17), Capsídeo (p24) e Nucleocapsídeo (p7); Enzimas: Transcriptase Reversa (p66/51), Protease (p13), Integrase (p31) e dUTPase (p14). Modificado de LECOLLINET e RICHARDSON, 2008.

Possui organização genômica e patogenia semelhante ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), por isso tem sido amplamente estudado como modelo experimental para estudos de imunopatogênese e interação vírus-hospedeiro, assim como o desenvolvimento de vacinas e terapia anti-retroviral (TALBOTT et al., 1989; BURKHARD e DEAN, 2003; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008; TOMPKINS e TOMPKINS, 2008; MÜNK et al., 2010).

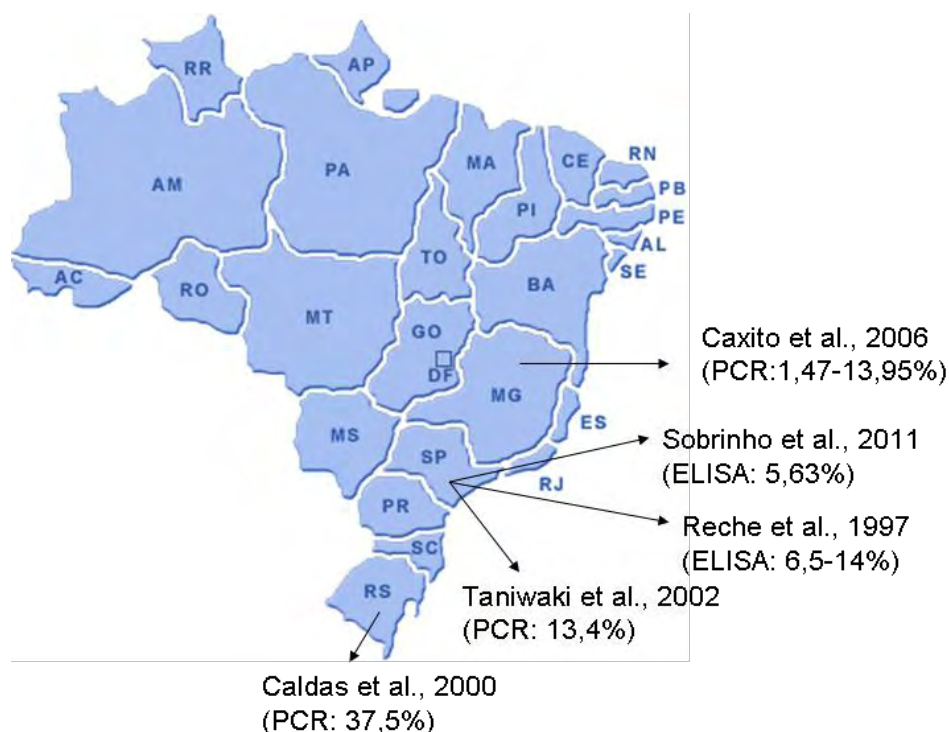
Apresenta organização genômica complexa, possuindo, além dos genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, vários outros que codificam proteínas não estruturais (Figura 2). Nas extremidades 5' e 3' do DNA pró-viral integrado ao cromossomo da célula hospedeira, encontram-se regiões repetidas denominadas “*Long Terminal Repeats*” (LTRs), que contêm as informações para a iniciação e terminação da transcrição (HARTMANN, 1998; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008).



**FIGURA 2:** Organização do genoma proviral do Vírus da Imunodeficiência Felina. Gene *gag* (AntiGeno Grupo-específico): composto por regiões codificadoras das proteínas de matriz (MA-p17), capsídeo (CA-p24), e nucleocapsídeo (NC-p7). Gene *pol*: responsável pela produção das enzimas protease (PR-p13), transcriptase reversa (RT-p66/51), deoxiuridina trifosfatase (DU-p14) e integrase (IN-p31). Gene *env*: que possui as seqüências das glicoproteínas de superfície (SU-gp95) e transmembrana (TM-gp36). LTR: *Long terminal repeats*. Demais genes (*vif*, *rev* e *ORF-A*) representam genes regulatórios. Modificado de LECOLLINET e RICHARDSON, 2008.

O FIV possui distribuição mundial e é classificado em 5 subtipos bem caracterizados (A-E) por comparação da sequência de nucleotídeos da região variável V3-V5 do gene *env* (KAKINUMA et al., 1995; HOHDATSU et al., 1996; PECORARO et al., 1996; DUARTE et al., 2002; NAKAMURA et al., 2003). Sua prevalência varia de 1 a 44%, dependendo da condição de saúde dos gatos investigados (HARTMANN, 1998; LEVY et al., 2006; HARTMANN et al., 2007). No Brasil (Figura 3), estudos mostraram a ocorrência de 1,47 a 37,5% (ECHE et al., 1997; CALDAS et al., 2000; CAXITO et al., 2006; LARA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2011) e até o momento apenas a presença do subtipo B (CAXITO et al., 2006; LARA et al., 2007; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010). A prevalência do FIV é influenciada pelo comportamento do animal. Gatos machos de vida livre, vivendo em áreas com alta densidade populacional, constituem o grupo de risco. Isso ocorre principalmente pela maior exposição a mordeduras, que é a principal forma de transmissão da doença, durante as brigas por demarcação de território (HARTMANN, 1998).

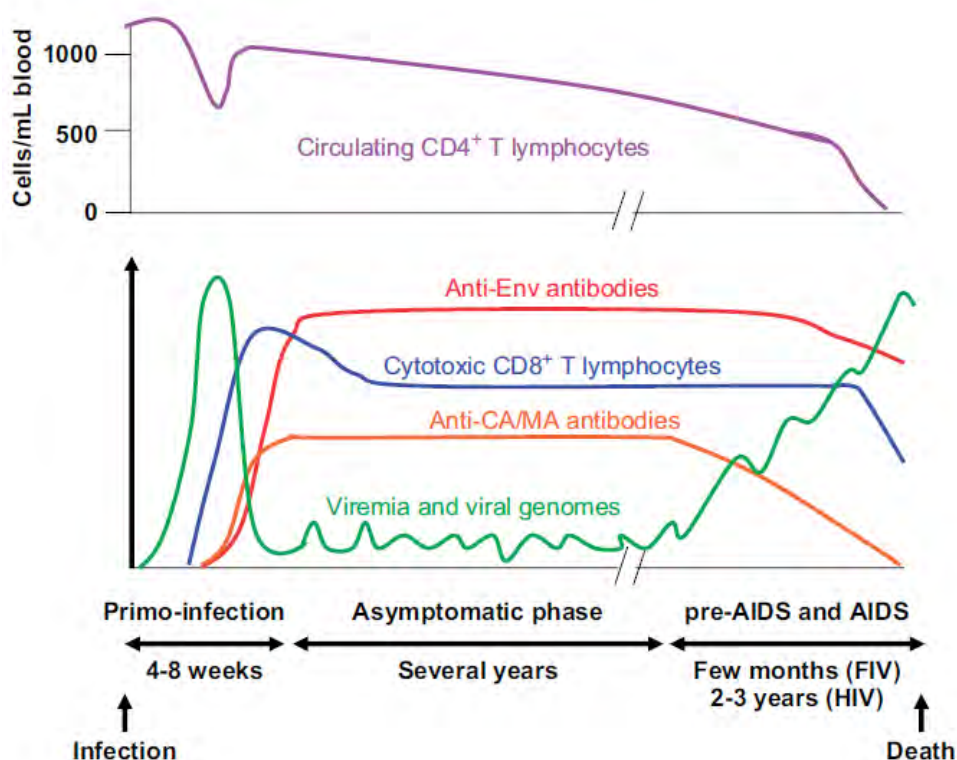
As vias de transmissão venérea, intrauterina e transmamária também são relatadas, no entanto são raras durante a infecção natural (O'NEIL et al., 1995; ALLISON e HOOVER, 2003; MEDEIROS et al., 2012).



**FIGURA 3:** Ocorrência da infecção pelo FIV no Brasil.

Logo após a infecção, a replicação viral ocorre em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Uma marcante viremia é detectada por volta da segunda semana pós-infecção (p.i.), com pico entre 8 a 12 semanas (Figura 4), durante a qual o vírus se dissemina por todo o organismo (HARTMANN, 1998; DUNHAM, 2006; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008; HOSIE et al., 2009). Nesse primeiro estágio ou fase aguda, o animal pode apresentar sinais clínicos leves a moderados, como febre, linfadenopatia generalizada transitória, anorexia e apatia (CALLANAN et al., 1992; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008; HOSIE et al., 2009; ZANUTTO et al., 2011). A detecção de linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) *gag*-específicos pode ocorrer 2 semanas p.i., mesmo antes da soroconversão (BEATTY et al., 1996). Duas a oito semanas após a infecção, anticorpos específicos contra as proteínas do gene *env* (SU e TM) e *gag* (CA e MA) podem ser identificados, e a detecção do vírus no sangue começa se tornar mais difícil (DUNHAM, 2006;

LECOLLINET e RICHARDSON, 2008; HOSIE et al., 2009). Apesar do desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, o animal não é capaz de eliminar o vírus, o que permite o estabelecimento de uma infecção persistente pelo FIV (LECOLLINET e RICHARDSON, 2008). No entanto, esta resposta imune é capaz de diminuir a carga viral circulante, que marca o início da fase assintomática. Os gatos infectados permanecem nessa fase por muitos anos, ou até mesmo por toda a sua vida, com poucos sinais clínicos, contudo com imunodeficiência progressiva, onde se observa diminuição do número de linfócitos T  $CD4^+$  e inversão da proporção  $CD4^+/CD8^+$  (TOMPKINS et al., 2002; DUNHAM, 2006; HOSIE et al., 2009). Finalmente, uma parcela dos gatos FIV positivos chega ao segundo estágio ou fase terminal, que compreende os estágios de linfadenopatia generalizada, pré-AIDS e AIDS da infecção pelo HIV (HOSIE e BEATTY, 2007; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008). Nessa fase, ocorre imunossupressão grave e consequentemente diminuição de anticorpos neutralizantes contra o FIV, o que permite o aumento da carga viral e desenvolvimento de doenças causadas por infecções oportunistas ou secundárias crônicas, neoplasias ou anormalidades neurológicas que podem ser fatais (DUNHAM, 2006; LECOLLINET e RICHARDSON, 2008).



**FIGURA 4:** Patogênese da infecção pelo FIV. LECOLLINET e RICHARDSON, 2008.

## **2.2. Diagnóstico da infecção pelo FIV**

### **2.2.1. Diagnóstico Direto**

A patogênese do FIV mostra que os gatos apresentam baixa quantidade de vírus circulante durante grande parte do período de infecção, portanto os testes sorológicos não são capazes de detectar os antígenos do FIV no sangue da maioria dos gatos infectados, pois não alcançam o limiar de sensibilidade destes testes (BARR, 1996; LEVY et al., 2008). No entanto, o FIV pode ser isolado do sangue, soro, plasma, líquido e saliva de gatos com infecção natural ou experimental (HARTMANN, 1998). A detecção viral clássica de isolamento viral em cultivo celular pode ser realizada em todas as fases clínicas da doença, mas demoram pelo menos duas semanas para confirmação do resultado e possui custo elevado, portanto não apresentam praticidade para rotina diagnóstica (HARTMANN, 1998; CRAWFORD e LEVY, 2007; HOSIE et al., 2009). O diagnóstico direto também pode ser realizado pela detecção do DNA pró-viral pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), disponível em laboratórios comerciais (BIENZLE et al., 2004). A PCR tem sido amplamente utilizada, contudo devido à alta variabilidade genética comum aos lentivírus, alguns estudos têm demonstrado resultados variáveis, sendo necessários estudos prévios do subtipo circulante na região e também controle de qualidade rigoroso para evitar a contaminação do ambiente laboratorial (BIENZLE et al., 2004; CRAWFORD et al., 2005).

### **2.2.2. Diagnóstico indireto**

Os gatos infectados pelo FIV não eliminam a infecção, assim a detecção de anticorpos circulantes tem uma correlação direta com a infecção viral (PEDERSEN e BARLOUGH, 1991). Os anticorpos normalmente aparecem dentro de 2 a 8 semanas após a infecção e, com poucas exceções, os animais infectados permanecem com anticorpos séricos facilmente detectáveis contra o vírus por toda a vida (PEDERSEN e BARLOUGH, 1991; BIENZLE et al., 2004). Na maioria dos gatos infectados, primeiramente ocorre o aparecimento dos anticorpos contra as proteínas do envelope, e logo após anticorpos contra as

outras proteínas estruturais (VERSCHOOR et al., 1993; HARTMANN, 1998). No entanto, uma pequena proporção de gatos infectados nunca atinge uma concentração de anticorpos detectáveis no sangue, o que ocorre também nos estágios finais da doença (HARTMANN, 1998). Além disso, a presença de anticorpos anti-FIV em gatos jovens não significa necessariamente que o animal está infectado. Anticorpos maternos podem permanecer circulantes por até 4 meses ou mais, resultando em falso-positivo. Por isso, recomenda-se testar apenas os gatos com idade superior a 8 meses (BARR, 1996).

Com o início do uso de uma vacina inativada de vírus inteiro, o diagnóstico da infecção pelo FIV se tornou mais complicado (CRAWFORD e LEVY, 2007). Isso porque, após a vacinação ocorre uma resposta intensa de anticorpos que pode persistir por mais de 4 anos em alguns gatos, e pode ser passada aos filhotes através do colostro (LEVY et al., 2008). Apesar de Kusuhara e colaboradores (2007) desenvolverem um teste de ELISA discriminante que apresentou 97,1% de acurácia, os testes sorológicos disponíveis até o momento não são capazes de distinguir os animais infectados dos animais vacinados, assim como gatos que são ambos vacinados e infectados (LEVY et al., 2004; RICHARDS, 2005; CRAWFORD e LEVY, 2007). Portanto, a vacinação só é indicada em alguns casos e é recomendada a realização de teste sorológico antes da vacinação (RICHARDS et al., 2006).

Os anticorpos contra o FIV podem ser detectados pela Imunofluorescência (IFA) através de células CRFK ou linfócitos T infectados pelo FIV como substrato, pelo Western blotting (WB) ou pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) (PEDERSEN e BARLOUGH, 1991).

### **2.3. ELISA**

O ELISA é uma técnica amplamente utilizada para o diagnóstico de infecções virais, pois é um método com alta sensibilidade, rápido, simples e versátil, que permite a automação e o processamento tanto de um pequeno como um grande número de amostras (SPENCER et al., 2007). No entanto, tende a gerar resultados falso-positivos, o que diminui o valor preditivo positivo do teste, principalmente em populações com baixa prevalência da doença, como ocorre na infecção pelo FIV (CALZOLARI et al., 1995; JACOBSON e

ROMATOWSKI, 1996). A interação altamente específica entre o antígeno e o anticorpo é o ponto crucial do ELISA, pois é responsável pela especificidade do teste.

### **2.3.1. ELISA com antígenos virais recombinantes**

A produção de antígenos virais para detecção de anticorpos é realizada, tradicionalmente, pelo cultivo e purificação viral. Porém, alguns vírus não são cultiváveis e outros não crescem em quantidade suficiente para produção de proteína em grande escala, e muitas vezes o processo de purificação é complexo (SPENCER et al., 2007). A tecnologia de produção de proteínas recombinantes consegue superar essas limitações, uma vez que possibilita a produção de grande quantidade de proteínas virais e utiliza métodos que facilitam a sua purificação e diminui a co-purificação de contaminantes presentes nos cultivos celulares. O uso de caudas que possuem afinidade a metais ou anticorpos facilita a purificação e detecção da proteína recombinante (FORD et al., 1991; SPENCER et al., 2007). A presença de cauda solúvel na porção amino (N') terminal pode aumentar a solubilidade da proteína, assim como na porção carboxi (C') terminal pode evitar a purificação de proteínas truncadas. A cauda de histidina, que tem afinidade ao níquel, interage pouco com o restante da proteína produzida, portanto não requer clivagem após a purificação (SPENCER et al., 2007; WAUGH et al., 2005). Além disso, o uso de bactérias para a produção do antígeno elimina qualquer variabilidade causada pela replicação viral em cultivos celulares. O uso de um sistema de expressão procarioto também elimina a possibilidade de contaminação com outros antígenos felinos. O alto nível de expressão em *Escherichia coli* (*E. coli*) contribui para a pureza do preparado final do antígeno, o que aumenta a especificidade do ELISA (MERMER et al., 1992).

### **2.3.2. Antígenos recombinantes utilizados no diagnóstico da infecção pelo FIV**

Os produtos do gene *gag* são antigênicos, conservados entre os diferentes isolados e possuem alta reatividade no Western blot (EGBERINK, et

al., 1991; REID et al., 1991; MERMER et al., 1992). A proteína de capsídeo (p24) possui peso molecular de 24 kDa e é altamente conservado dentro de cada espécie viral (ROSATI et al., 2004). Reid e colaboradores (1991) demonstraram o aumento da sensibilidade na detecção de animais FIV positivos do ELISA com a p24 em associação com a proteína da matriz (p17) em relação ao uso de cada antígeno sozinho. O ELISA com associação da p17 e p24 mostrou concordância de 100% com o ELISA com vírus inteiro, o que mostra a boa reatividade dos antígenos recombinantes (MERMER et al., 1992). A glicoproteína de superfície (SU) possui regiões fortemente imunogênicas (SU3, SU4 e SU6), porém a resposta antigênica é baixa e variável quando se utiliza a expressão em procariotos, pois se trata de uma região altamente glicosilada (de RONDE et al., 1994; CALZOLARI et al., 1995). A glicoproteína transmembrana (TM) do envelope contém uma sequência de aminoácidos altamente conservada em muitos lentivírus com dois resíduos de cisteína, que forma um epítipo imunodominante responsável por uma forte indução de anticorpos durante a infecção pelo FIV (AVRAMEAS et al., 1993; de RONDE et al., 1994; ROSATI et al., 2004). Esse peptídeo TM possui uma reatividade sorológica que se desenvolve rapidamente em altos títulos após a infecção e se mantém em níveis elevados durante toda a infecção. Em outros lentivírus, como o HIV, o vírus da imunodeficiência dos símios (SIV) e o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), o respectivo epítipo TM imunodominante também tem sido usado como reagente em testes sorológicos (CHONG, et al., 1991; FONTENOT et al, 1992). Os anticorpos gerados contra o epítipo TM não são neutralizantes, no entanto, essa estrutura é reconhecida precocemente em todos os animais infectados e representa um importante marcador para o desenvolvimento de métodos diagnósticos (ROSATI et al., 2004).

Atualmente, existem “kits” comerciais disponíveis para uso em clínicas veterinárias baseadas no ELISA, que possuem o antígeno p24, e também nos testes imunocromatográficos, que contêm um peptídeo sintético equivalente à proteína transmembrana gp40. Estudos demonstraram que os testes possuem sensibilidade diagnóstica de 43,1 a 97,3% e especificidade diagnóstica de 97,1 a 99,7% (HARTMANN et al., 2001). Existem estudos que demonstram que os anticorpos contra a proteína p24 não foram detectados em alguns gatos infectados pelo FIV, sendo apenas reativos a glicoproteínas do envelope (SU e

TM) (EGBERINK, et al., 1992; AVRAMEAS et al., 1993). Rosati e colaboradores (2004) relataram o aumento da sensibilidade do teste de ELISA com a combinação de proteínas do antígeno de capsídeo (p24) e o epítipo transmembrana (TM). Em humanos, a detecção de anticorpos anti-HIV, através de proteínas de fusão p24-gp41 recombinantes, mostrou 100% de sensibilidade e 99,5% de especificidade (MAHBOUDI et al., 2006). Mais recentemente, Hartmann e colaboradores (2007), publicaram novo estudo sobre a qualidade dos testes disponíveis para o diagnóstico do FIV e obtiveram resultados melhores que no estudo anterior com o kit SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test (IDEXX, USA), com sensibilidade de 100% e especificidade de 99,6%. Isso pode ser explicado pela incorporação de antígenos adicionais no sistema, que utiliza hoje os antígenos p24, p17 e gp40 (CRAWFORD e LEVY, 2007; HARTMANN et al., 2007; HOSIE et al., 2009).

## **2.4. WESTERN BLOT**

O Western blot é considerado padrão-ouro para o diagnóstico sorológico da infecção pelo FIV e é utilizado como teste confirmatório de resultados inconclusivos, pois possui alta especificidade (PEDERSEN e BARLOUGH, 1991; HOSIE et al., 2009). Infelizmente, também não diferencia anticorpos vacinais, apresentando apenas 54% de especificidade quando são testados animais vacinados (LEVY et al., 2004). Mesmo assim, ainda é amplamente utilizado para avaliar a sensibilidade e especificidade de testes comerciais e em desenvolvimento (BIENZLE et al., 2004; HARTMANN et al., 2007). A técnica de Western blot utiliza como antígenos lisados de células infectadas ou partículas virais purificadas tratadas com detergente, que são separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (BARR, 1996). Pode ser visualizada a reação contra as proteínas do gene *gag* (p24, p15, p10) e seu possível precursor (p55) e também proteínas do envelope gp40 e gp95 ou seu precursor gp130 (STEINMAN et al., 1990; EGBERINK et al., 1991; CALANDRELLA et al., 2001).

Apesar de não possuir a mesma praticidade do ELISA na rotina diagnóstica, o Western blot pode avaliar a resposta do animal contra determinado antígeno do FIV. Egberink e colaboradores (1991) mostraram que

alguns animais só apresentam anticorpos contra proteínas do envelope, justificando a incorporação dessa proteína em testes diagnósticos. Também foi demonstrado que há uma diferença quantitativa na resposta contra as proteínas internas do FIV (p24 e p17), onde animais saudáveis apresentaram maior título de anticorpos em relação aos gatos com sinais clínicos. A perda da reatividade com o antígeno p24 pode estar relacionada com o aparecimento de sinais de imunossupressão e pior prognóstico da doença (EGBERINK et al., 1992; KOHMOTO et al., 1998). Portanto, os anticorpos contra proteínas do gene *gag* podem estar relacionados com a supressão da replicação do FIV durante a infecção (KOHMOTO et al., 1998). Na infecção pelo HIV, também é relatado que a diminuição de anticorpos anti-p24 está associada à progressão da doença e desenvolvimento da AIDS (KOHMOTO et al., 1998; CALANDRELLA et al., 2001).

Visto isso, nota-se a importância da produção de antígenos recombinantes do FIV para o desenvolvimento de testes sorológicos, que podem ser utilizados para verificar a presença de anticorpos específicos usados como fator prognóstico. Mas também para obter um diagnóstico acurado, prático e de baixo custo, utilizando a combinação de antígenos. No Brasil, o diagnóstico da infecção pelo FIV é realizado utilizando “kits” comerciais importados ou pela PCR disponibilizada por alguns laboratórios particulares e públicos, mas ambos apresentam custo elevado. Isso dificulta a realização do diagnóstico definitivo de uma das doenças infecciosas mais importantes que acomete os felinos, e até mesmo o conhecimento da real prevalência da doença no nosso país.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

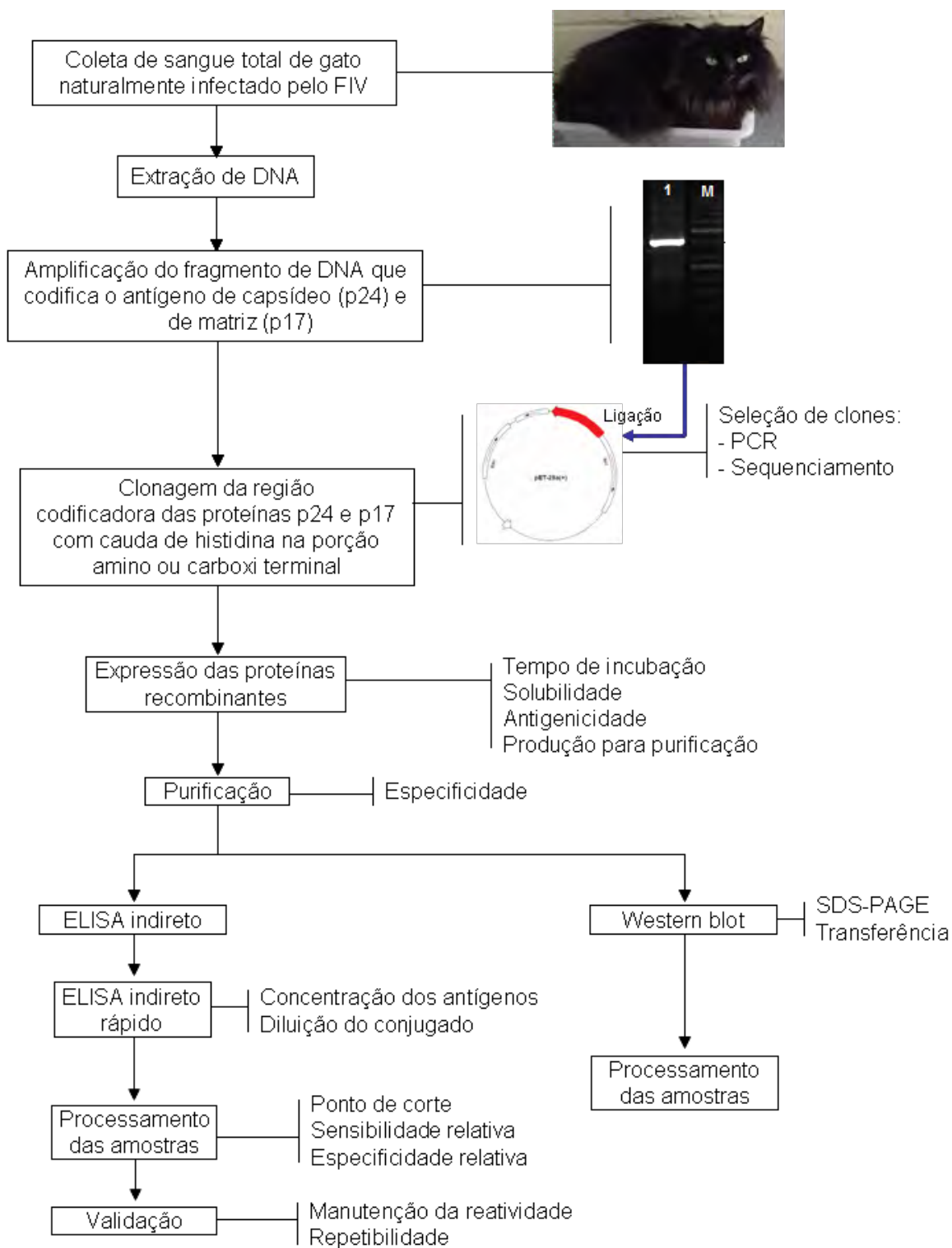
- Produzir antígenos recombinantes do vírus da imunodeficiência felina (FIV) para padronizar e validar técnicas sorológicas para o diagnóstico da infecção pelo FIV em gatos domésticos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Padronizar a clonagem e expressão dos antígenos de capsídeo (p24) e de matriz (p17) do FIV em sistema procarioto (*E. coli*) utilizando cauda de histidina na porção amino ou carboxi terminal;
- Comparar o desempenho dos antígenos recombinantes produzidos, assim como o peptídeo transmembrana (TM) sintético e a proteína de fusão FIVp24/TM no ELISA indireto.
- Padronizar um teste sorológico rápido (ELISA indireto rápido) e um teste confirmatório (Western blot) com antígenos recombinantes para a detecção de anticorpos anti-FIV;
- Validar e aplicar os testes padronizados no diagnóstico da infecção pelo FIV.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Etapas da pesquisa



## **4.2. Amostras**

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ-UNESP), protocolos 58/2007-CEEA e 130/2009-CEUA.

As amostras foram coletadas com o auxílio de contenção física e punção da veia jugular ou cefálica. Para a extração de DNA foram coletadas amostras de sangue total de 4 gatos naturalmente infectados pelo FIV. Para a padronização e validação dos testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo FIV foram utilizados 114 amostras de soro ou plasma de gatos, sendo que 100 amostras foram provenientes de outro experimento<sup>1</sup>. Todas as amostras de soro ou plasma foram testadas com o SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test (IDEXX laboratories).

## **4.3. Extração de DNA**

O DNA pró-viral foi extraído de amostras de sangue total de gatos FIV positivos utilizando-se o GFX<sup>™</sup> Genomic Blood DNA Purification Kit<sup>®</sup> (Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>) ou Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare Life Science), de acordo com o protocolo do fabricante. A confirmação da presença do DNA pró-viral foi realizada pela PCR para amplificação do gene *gag* utilizada na rotina do laboratório de diagnóstico molecular (LDM).

## **4.4. Amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17 do FIV**

### **4.4.1. Oligonucleotídeos iniciadores**

A amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas p24 (capsídeo) e p17 (matriz) do FIV foi realizada com os oligonucleotídeos

---

<sup>1</sup> Gentilmente cedida pela Profa Dra Mitika Kuribayashi Hagiwara e a aluna de doutorado Aline Santana da Hora (FMVZ-USP)

iniciadores (*primers*) descritos na tabela 1, que foram desenhados a partir de seqüências já descritas na literatura (TALBOTT et al., 1989; REID et al., 1991; ROSATI et al., 2004), com algumas modificações.

Os *primers* sensores FIVp24N'/Fw-BamHI e FIVp17N'/Fw-BamHI contêm sítio de restrição *Bam*HI e os *primers* reversos FIVp24N'/Rev-HindIII e FIVp17N'/Rev-HindIII contêm sítio de restrição *Hind*III (tabela 1) para facilitar a clonagem no vetor de expressão pET 28a (Novagen®), em fase de tradução com a cauda de histidina (6xHis) na porção amino N' terminal. Além disso, os *primers* reversos FIVp24N'/Rev-HindIII e FIVp17N'/Rev-HindIII possuem uma seqüência que transcreve o códon de terminação (UAA) para sinalizar a terminação da proteína p24 e p17, respectivamente. Já os *primers* sensores FIVp24C'/Fw-NcoI e FIVp17C'/Fw-NcoI contêm sítio de restrição *Nco*I e os *primers* reversos FIVp24C'/Rev-HindIII e FIVp17C'/Rev-HindIII contêm sítio de restrição *Hind*III (tabela 1), para facilitar a clonagem no vetor de expressão pET 28a (Novagen®), em fase de tradução com a cauda de histidina (6xHis) na porção C' terminal.

**TABELA 1:** *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas de capsídeo (p24) e matriz (p17) do FIV.

| <b>Primer</b>        | <b>Seqüência 5' – 3'</b>                                                  |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| FIVp17C'/Fw-NcoI     | AAA <u>ACC ATG GGG</u> AAT GGA CAG GG <sup>*</sup>                        |
| FIVp17C'/Rev-HindIII | TTT <u>AAG CTT</u> ATA AGC CTG TGG AGG TCC <sup>*</sup>                   |
| FIVp17N'/Fw-BamHI    | TTG <u>GAT CCA</u> TGG GGA ATG GAC AGG G <sup>*</sup>                     |
| FIVp17N'/Rev-HindIII | AAT <u>AAG CTT</u> <b>TTA</b> ATA TGC CTG TGG AGG <sup>*,**</sup>         |
| FIVp24C'/Fw-NcoI     | TTT <u>TCC ATG GGT</u> CCT ATT CAA ACA GTA AAT G <sup>*</sup>             |
| FIVp24C'/Rev-HindIII | AAT <u>AAG CTT</u> CAA GAG TTG CAT TTT ATA TCC <sup>*</sup>               |
| FIVp24N'/Fw-BamHI    | TTG <u>GAT CCC</u> CTA TTC AAA CAG TAA ATG GA <sup>*</sup>                |
| FIVp24N'/Rev-HindIII | AAA <u>AAG CTT</u> <b>TTA</b> CAA GAG TTG CAT TTT ATA TCC <sup>*,**</sup> |

\*nucleotídeos sublinhados são sítios de reconhecimento das respectivas enzimas de restrição.

\*\*nucleotídeos em negrito serão transcritos em códon de terminação.

#### **4.4.2. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal**

A amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina na porção N' terminal foi realizada como descrito por ROSATI *et al.*, 2004, com algumas alterações que foram previamente padronizadas (TANIWAKI, 2009). Para a reação de amplificação foram utilizados os *primers* FIVp24N'/Fw-BamHI e FIVp24N'/Rev-HindIII (tabela 1), sendo esperado um produto de 684 pares de base (bp), contendo a sequência que codifica a proteína de capsídeo inteira. A PCR foi realizada num volume final de 50 µL, contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,6, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer*, 1 U de FidelityTaq™ DNA polymerase (USB®) e 10 µL do DNA extraído. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 min para desnaturação da fita de DNA, 50 °C por 1 min para a hibridização dos *primers* e 72 °C por 2 min para a extensão das fitas, e a fase de extensão final de 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®).

#### **4.4.3. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal**

Para a amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina na porção N' terminal, foram utilizados os *primers* FIVp17N'/Fw-BamHI e FIVp17N'/Rev-HindIII (tabela 1), e a técnica de *Touchdown PCR*, sendo esperado um produto de 425 bp. A reação de amplificação foi realizada num volume final de 50 µL, contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,6, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer*, 1 U de FidelityTaq™ DNA polymerase (USB®) e 10 µL do DNA extraído. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida de 10 ciclos de 94 °C por 1 min para desnaturação da fita de DNA, temperatura inicial de 60 °C por 30 seg com redução de 1 °C a cada ciclo (chegando a 50 °C no décimo ciclo) para a hibridização dos *primers*, e 72 °C por 1 min para a extensão das fitas. Em seguida, foram realizados mais 25

ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 30 seg, e 72 °C por 1 min, e por fim a fase de extensão final de 72 °C por 5 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

#### **4.4.4. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal**

Para a reação de amplificação foram utilizados os *primers* FIVp24C'/Fw-NcoI e FIVp24C'/Rev-HindIII (tabela 1), sendo esperado um produto de 689 bp, contendo a seqüência que codifica a proteína de capsídeo em fase com a cauda de histidina C' terminal. A reação foi realizada num volume final de 50 µL, contendo AccuTaq LA 1x Buffer (50 mM Tris-HCl, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 9,3 ajustado com NH<sub>4</sub>OH), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20), 200 µM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 U de AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich®) e 10 µL do DNA extraído. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 98°C por 30 seg, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 15 seg para desnaturação da fita de DNA, 50 °C por 30 seg para a hibridização dos *primers* e 68 °C por 1 min para a extensão das fitas, e a fase de extensão final de 68 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen™).

#### **4.4.5. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal**

Para a reação de amplificação foram utilizados os *primers* FIVp17C'/Fw-NcoI e FIVp17C'/Rev-HindIII, sendo esperado um produto de 420 bp, contendo a seqüência que codifica a proteína de matriz do FIV em fase com a cauda de histidina na porção C' terminal. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada numa reação com volume final de 50 µL, contendo AccuTaq LA 1x Buffer (50 mM Tris-HCl, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 9,3 ajustado com NH<sub>4</sub>OH), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20), 200 µM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 U de AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich®) e 10 µL do DNA extraído. Para a amplificação do fragmento FIVp17C'/NcoI/HindIII utilizou-se a técnica de *Touchdown PCR* com as mesmas condições já padronizadas para a

amplificação do fragmento FIVp17BamHI/HindIII (item 4.4.3), com algumas modificações. A amplificação foi realizada da seguinte forma: desnaturação inicial a 98 °C por 30 min; seguido de 10 ciclos de 94 °C por 15 seg para desnaturação da fita de DNA, temperatura inicial de 60 °C por 30 min com redução de 1 °C/ciclo (chegando a 50 °C) para a hibridização dos *primers* e 68 °C por 1 min para a extensão; seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 68 °C por 1 min, e extensão final a 68 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>).

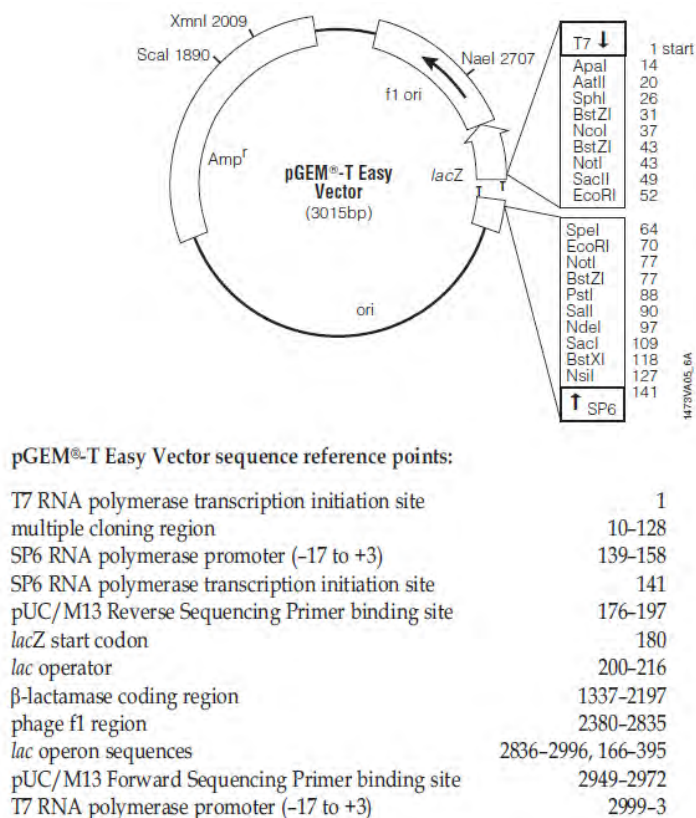
#### **4.5. Clonagem dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17 do FIV**

##### **4.5.1. Vetores utilizados na clonagem**

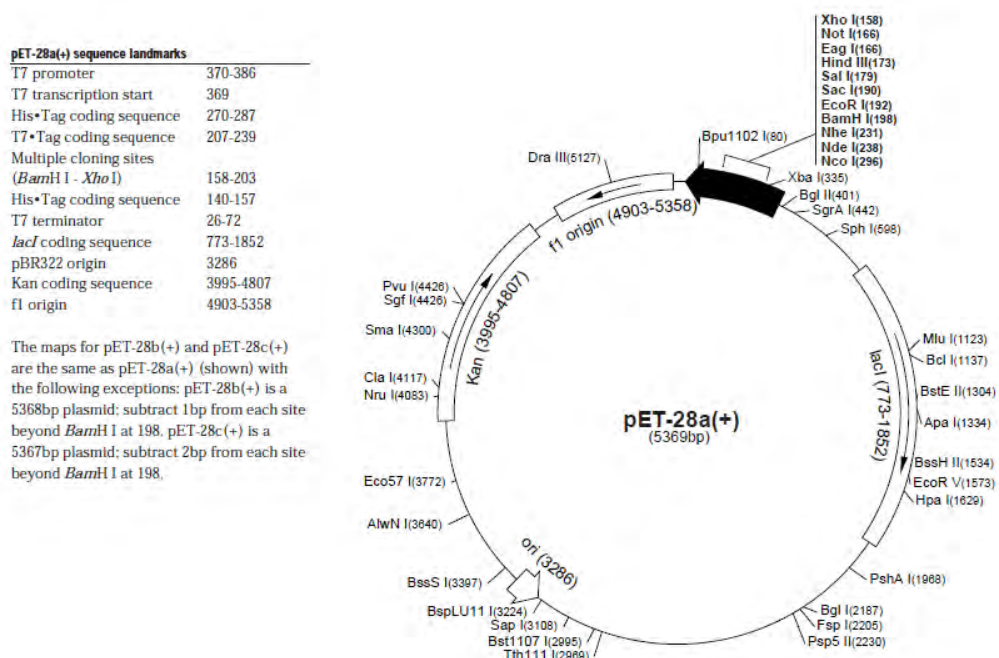
O plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega<sup>®</sup>) foi utilizado na etapa inicial de clonagem do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII, por ser um plasmídeo contendo vários sítios de restrição facilitando a clonagem e seleção (Figura 5). Para a produção das proteínas recombinantes p24 e p17 do FIV foi utilizado o vetor de expressão pET 28a (Novagen<sup>®</sup>), que é um sistema de clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*, que possui um forte promotor T7//*lac*. Esse vetor permite a regulação da expressão de genes inseridos pela ação da RNA polimerase do bacteriófago T7 produzida pela célula hospedeira, através do repressor *lac*. (Figura 6).

##### **4.5.2. Preparo e congelamento de células competentes**

A bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) cepa DH5α ou JM109 foram utilizadas para realizar a propagação dos vetores recombinantes pGEM<sup>®</sup> e pET 28a, pois possui alta eficiência de transformação. Ao passo que, para a produção das proteínas recombinantes foi utilizada a *E.coli* cepa BL21 (DE3), que possui em seu DNA cromossomal uma cópia do gene que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7, controlado por um promotor *lac*, e também possui o gene *lac I*, que codifica o repressor *lac*.



**FIGURA 5:** Mapa e pontos de referência da sequência do plasmídeo pGEM®-T Easy Vector (PROMEGA, 2009).



**FIGURA 6:** Mapa e pontos de referência da sequência do plasmídeo pET 28a (NOVAGEN, 1998).

Para a introdução dos plasmídeos recombinantes na bactéria foi utilizado o procedimento de transformação físico-química. Para o preparo de bactérias competentes, foi realizado um pré-inóculo de uma colônia isolada em 3 mL de caldo SOB (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 8,5 mmol/L NaCl, 2,5 mmol/L KCl - SAMBROOK et al., 1989) sem antibiótico, que foi incubada a 37 °C sob agitação de 220 rpm durante 16 h. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para 50 mL de caldo SOB sem antibiótico e incubada a 37 °C/ 220 rpm até atingir absorvância entre 0,5 a 0,6 em um comprimento de onda de 600 nm ( $A_{600}$ ). Em seguida, o frasco foi colocado no gelo e adicionou-se 1 mL de  $MgCl_2$  (1 mol/L) gelado. Após incubação de 30 min, a cultura foi dividida em dois frascos e centrifugada a 3000 x g por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso gentilmente em 10 mL de RF1 (0,1 mol/L KCl, 50 mmol/L  $MnCl_2$ , 30 mmol/L  $KC_2H_3O_2$  (pH 6,9), 10 mmol/L  $CaCl_2$ , 15% glicerol) filtrada e gelada. Após incubação de 15 min no gelo e centrifugação a 3000 x g por 15 min a 4 °C, o *pellet* foi ressuspenso gentilmente em 1 mL da solução RF2 (10 mmol/L NaMOPS (pH 7,0), 10 mmol/L KCl, 74 mmol/L  $CaCl_2$ , 15% glicerol) gelada e filtrada. As bactérias foram divididas em alíquotas de 100 µL, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C até o momento do uso.

#### **4.5.3. Clonagem do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII**

Para a clonagem do fragmento que codifica a proteína p24 com cauda de histidina na porção N' terminal (FIVp24 BamHI/HindIII) foi necessária a clonagem inicial no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega<sup>®</sup>) e posterior subclonagem no vetor de expressão pET 28a (Novagen<sup>®</sup>).

##### **4.5.3.1. Clonagem inicial no plasmídeo pGEM-T Easy**

O fragmento FIVp24 BamHI/HindIII foi purificado com o kit NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (Macherey-Nagel<sup>®</sup>), seguindo protocolo do fabricante. Em seguida, a quantidade de DNA foi estimada em gel de agarose 1,5% em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>®</sup>). O DNA purificado foi inserido no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega<sup>®</sup>), conforme orientações do

fabricante. Esse plasmídeo recombinante, denominado pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII, foi utilizado para transformar a *E. coli* cepa JM109, que foi semeada em meio LB ágar (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 17 mM NaCl, 1,5% de ágar bacteriológico - SAMBROOK et al., 1989) contendo 100 µg/mL de ampicilina e, 100 µL de IPTG (isopropil 1 β-tiogalactopiranosídeo - 100 mmol/L) e 20 µL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosídeo - 50 mg/mL) aplicados na sua superfície. Os clones foram selecionados realizando-se PCR das colônias utilizando *primers* do vetor descritos pelo fabricante (pGEM-TF 5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3' e pGEM-TR 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'). A reação foi realizada num volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL do GoTaq® Green Master Mix (Promega®), 0,4 µM de cada *primer* e pequena quantidade da colônia. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de lise das bactérias e desnaturação a 94 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 1 min para desnaturação da fita de DNA, 51 °C por 1 min para a hibridização dos *primers* e 72 °C por 1 min para a extensão das fitas, e a fase de extensão final de 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®). Os plasmídeos dos clones positivos na PCR (presença de produtos de PCR com tamanho esperado de aproximadamente 935 bp) foram propagados em caldo LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 17 mM NaCl - SAMBROOK et al., 1989) contendo 100 µg/mL de ampicilina, extraídos com o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel®), conforme protocolo do fabricante, e quantificados no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

#### 4.5.3.2. Subclonagem no vetor de expressão pET 28a

Os clones do plasmídeo recombinantes pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII foram digeridos por 16 h a 37 °C com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Fermentas®), assim como o vetor de expressão pET 28a (Novagen®), conforme recomendação do fabricante. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®). O fragmento relativo ao inserto FIVp24 BamHI/HindIII (aproximadamente 700 bp) e o plasmídeo pET28a linearizado foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System

(Promega®). Em seguida, foram ligados utilizando-se a T4 DNA Ligase (Promega®), conforme protocolo do fabricante, em fase com a cauda de histidina na porção N' terminal. Foi realizada PCR utilizando 0,3 µL da reação de ligação, 12,5 µL GoTaq® Green Master Mix (Promega®) e 0,4 µM de cada *primer* do vetor pET (pET-T7 pro 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' e pET-T7 ter 5' GCTAGTTAT TGCTCAGCGG 3') para ter certeza que a ligação ocorreu (reação 1) e, para confirmar a orientação correta do inserto foram utilizados os *primers* pET-T7 pro e FIVp24N'/Rev-HindIII em uma reação (2) e pET-T7 ter e FIVp24N'/Fw-BamHI em outra reação (3). A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de lise das bactérias e desnaturação a 94 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 1 min para desnaturação da fita de DNA, 51 °C por 1 min para a hibridização dos *primers* e 72 °C por 1 min para a extensão das fitas, e a fase de extensão final de 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®). Foi considerado sucesso da reação de ligação quando os produtos de PCR possuíam tamanho esperado de aproximadamente 987, 872 e 798 bp, respectivamente nas reações 1, 2 e 3. O vetor pET28a recombinante (pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII) foi utilizado para transformar a *E. coli* JM109, que foi semeada em LB ágar contendo 30 µg/mL de canamicina. Os clones foram selecionados pela PCR das colônias utilizando *primers* do vetor pET com as mesmas condições de reação, amplificação e análise já descritos acima. Foram extraídos com o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel®) os clones com produto da PCR de tamanho desejado de aproximadamente 987 bp.

#### 4.5.4. Clonagem do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII

O produto da PCR FIVp17 BamHI/HindIII foi purificado com o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®) e sua concentração foi estimada em gel de agarose 1,5% em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®). Esse fragmento purificado e o vetor de expressão pET 28a (Novagen®) foram submetidos à digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Fermentas®), conforme orientação do fabricante. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a

1%. O fragmento FIVp17 BamHI/HindIII (aproximadamente 425 bp) e o plasmídeo pET28a linearizado foram purificados com o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®), e em seguida, suas concentrações foram estimadas em gel de agarose 1,5% em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®). A ligação foi realizada com a T4 DNA Ligase (Promega®), conforme protocolo do fabricante, em fase com a cauda de histidina na porção N' terminal.

Foi realizada PCR utilizando 0,3 µL da reação de ligação, 12,5 µL GoTaq® Green Master Mix (Promega®) e 0,4 µM de cada *primer* do vetor pET para ter certeza que a ligação ocorreu (reação 1) e, para confirmar a orientação correta do inserto foram utilizados os *primers* pET-T7 pro e FIVp17/Rev-HindIII em uma reação (2) e pET-T7 ter e FIVp17/Fw-BamHI em outra reação (3). A amplificação foi realizada como já descrito no item 4.5.3.2. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo esperadas bandas positivas de aproximadamente 727, 613 e 539 bp, respectivamente nas reações 1, 2 e 3. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar a *E. coli* cepa DH5α e semeada em meio LB ágar contendo 30 µg/mL de canamicina. Os clones foram selecionados pela PCR das colônias utilizando *primers* do vetor pET com as mesmas condições de reação, amplificação e análise descritos no item 4.5.3.2. Os clones com produtos de PCR de tamanho esperado de aproximadamente 727 bp foram extraídos com o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel®).

#### **4.5.5. Clonagem dos fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII**

Os fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®), e suas concentrações estimadas em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen™) em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™). Esses fragmentos purificados e o vetor de expressão pET 28a (Novagen®) foram submetidos à digestão dupla por 16 h a 37 °C com as enzimas *NcoI* e *HindIII* (Fermentas®), conforme orientação do fabricante. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%

corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>). Os fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII (aproximadamente 683 bp) e FIVp17 NcoI/HindIII (aproximadamente 413 bp), e o plasmídeo pET28a linearizado foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System (Promega<sup>®</sup>), e em seguida, estimadas as suas concentrações em gel de agarose 1% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>) em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>™</sup>) e High DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>™</sup>).

A reação de ligação do inserto FIVp24 NcoI/HindIII ou FIVp17 NcoI/HindIII com o vetor pET28a em fase com a cauda de histidina na porção C' terminal foi realizada utilizando-se a T4 DNA Ligase (Promega<sup>®</sup>) e incubação por 16 h a 16 °C, conforme protocolo do fabricante. Os plasmídeos recombinantes pET-FIVp24 NcoI/HindIII e pET-FIVp17 NcoI/HindIII foram utilizados para transformar a *E. coli* cepa DH5α através de transformação físico-química. Em seguida, foram semeadas em meio LB ágar contendo 30 µg/mL de canamicina, a 37 °C durante 16 h. Os clones foram selecionados pela PCR das colônias utilizando *primers* do vetor pET, como já descrito no item 4.5.3.2. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>). Os fragmentos dos clones que apresentaram tamanho esperado de aproximadamente 872 bp (pET-FIVp24 NcoI/HindIII) ou 602 bp (pET-FIVp17 NcoI/HindIII) na PCR foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System (Promega<sup>®</sup>), e quantificados em gel de agarose 1,5% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>) em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>™</sup>).

#### 4.6. Sequenciamento

Os clones dos plasmídeos de expressão pET28a contendo os fragmentos FIVp24 BamHI/HindIII e FIVp17 BamHI/HindIII selecionados, assim como os produtos de PCR purificados dos clones pET28a contendo os fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII, foram submetidos ao sequenciamento para confirmar a orientação correta do fragmento inserido e verificar a fase de leitura de tradução da proteína a ser produzida. Para tanto foi utilizado o BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 377 ou ABI 3500

(Applied Biosystems), conforme recomendação do fabricante e utilizando o *primer* senso ou reverso do vetor pET. Os valores de identidade das sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes foram calculados usando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 (HALL, 1999) em comparação com as sequências de referência do FIV subtipo A (Petaluma), B (TM-2), C (BM3070) e D (Shizuoka) disponíveis no banco de dados *GenBank* (número de acesso M25381, M59418, AF474246 e AY679785, respectivamente).

#### **4.7. Produção das proteínas recombinantes do FIV**

Os clones dos plasmídeos recombinantes pET28a contendo os fragmentos FIVp24 BamHI/HindIII e FIVp17 BamHI/HindIII selecionados pelo sequenciamento, foram utilizados para produzir as proteínas recombinantes p24 e p17 do FIV com cauda de histidina no porção N' terminal (FIVp24N' e FIVp17N', respectivamente). E os clones dos plasmídeos recombinantes pET28a contendo os fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII selecionados pela análise das sequências, foram utilizados para produzir as proteínas recombinantes p24 e p17 do FIV com cauda de histidina no porção C' terminal (FIVp24C' e FIVp17C', respectivamente). Para tanto, os clones selecionados foram propagados em caldo LB contendo 30 µg/mL de canamicina, submetidos à extração plasmideal com o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel®), conforme protocolo do fabricante, e quantificados no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Em seguida, esses plasmídeos recombinantes selecionados foram usados para transformar a *E. coli* cepa BL21(DE). Foi utilizado o protocolo de transformação físico-química, seguida de incubação a 37 °C durante 16 h em meio LB ágar contendo 30 µg/mL de canamicina. Os clones foram submetidos à PCR das colônias utilizando *primers* do vetor pET com as mesmas condições de reação, amplificação e análise descritos no item 4.5.3.2, e sequenciados conforme o item 4.6 para confirmar a presença dos fragmentos desejados. Os clones com sequências confirmadas foram propagados em caldo LB contendo 30 µg/mL de canamicina até atingirem absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) de 0,6 a 0,8, em seguida foram armazenados a -70 °C com 9% de glicerol até o momento do uso.

#### 4.7.1. Determinação do tempo de incubação após indução

Uma colônia isolada de *E. coli* cepa BL21(DE) contendo o pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII, pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII, pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII ou pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII foi usada para inocular 50 mL do meio LB líquido contendo 30 µg/mL de canamicina. Para ter certeza da produção da proteína desejada também foi utilizada uma colônia de *E. coli* cepa BL21(DE) com o plasmídeo pET28a sem inserto (controle negativo). Essas culturas foram incubadas a 37 °C a 220 rpm até atingirem a  $A_{600}$  de 0,5-0,6.

Atingida a absorvância desejada, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi retirada para ser o controle sem indução. A indução foi realizada com IPTG na concentração final de 0,1 mmol/L (concentração ideal já padronizada anteriormente para a produção da proteína FIVp24/TM - TANIWAKI, 2009). As culturas foram incubadas a 30 °C a 200 rpm. Para a determinação do tempo de incubação onde ocorre maior produção de proteína, foram coletadas alíquotas nos momentos 0, 30 min, 1, 2 e 3 h. Além disso, as culturas foram incubadas 16 h sob agitação de 200 rpm a 25 °C. A cada momento foi realizada leitura da  $A_{600}$  e uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi centrifugada e o *pellet* ressuspenso em 100 µL de Tampão de amostra SDS 1X (12 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Glicerol, 0,4% Sódio Dodecil-sulfato (SDS), 2,88 mmol/L 2-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol), fervido por 3 min e depois mantido no gelo para análise da fração total. A análise das alíquotas foi realizada pela SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação a 12,5% e coloração com Coomassie Blue.

#### 4.7.2. Determinação da solubilidade das proteínas recombinantes FIVp24N' e FIVp17N'

As culturas da *E. coli* cepa BL21(DE) com pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII e pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII induzidas com 0,1 mmol/L de IPTG e incubadas durante 3 h a 30 °C sob agitação de 200 rpm, foram submetidas à lise para determinar se as proteínas recombinantes se encontravam na fração

solúvel ou na fração insolúvel. Para isso, as células bacterianas foram centrifugadas a 5000 x g durante 15 min a 4 °C, lavadas 2 vezes em tampão fosfato (PBS), ressuspensas em tampão de lise (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazol, 1 mg/mL lisozima) a 1/10 do volume da cultura juntamente com 174 mg/mL de PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*). Em seguida, foram incubadas por 30 min a 4 °C e submetidas a agitação suave por 10 min/ TA. Foi adicionado 1% de TritonX-100 e as culturas incubadas 10 min/ TA sob agitação suave. Após centrifugação a 10.000 x g/ 30 min/ 4 °C foi coletado o sobrenadante (fração solúvel) e o *pellet* (fração insolúvel) foi ressuspendido em solução desnaturante (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazol e 8 mol/L de ureia). A análise das frações foi realizada pela SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação a 12,5% corado com Coomassie Blue.

#### **4.7.3. Determinação da solubilidade das proteínas recombinantes FIVp24C'e FIVp17C'**

As culturas da *E. coli* cepa BL21(DE) com pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII e pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII induzidas com 0,1 mmol/L de IPTG e incubadas sob agitação de 200 rpm durante 16 h a 25 °C foram submetidas à lise para determinar a solubilidade das proteínas recombinantes. Para isso, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 3000 x g durante 15 min a 4 °C, ressuspensas em tampão de lise (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 mol/L NaCl e 20 mmol/L de imidazol) a 1/10 do volume da cultura juntamente com 1 mg/mL de lisozima. Em seguida, foram incubadas por 10 min no gelo e sonicadas (6 ciclos, 30 seg com intervalo de 1 min, amplitude 20%) para ocorrer a lise da célula bacteriana. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e o *pellet* (fração insolúvel) foi ressuspendido em solução desnaturante. A análise das frações foi realizada pela SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação a 12,5% corado com Coomassie blue.

#### 4.7.4. Teste de antigenicidade das proteínas recombinantes do FIV

Com o intuito de confirmar a antigenicidade das proteínas FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C' e FIVp17C' frente a anticorpos produzidos por gatos naturalmente infectados pelo FIV, foi realizado um ELISA indireto. Para tanto, as frações solúvel e insolúvel das culturas FIVp24 BamHI/HindIII, FIVp17 BamHI/HindIII, FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII foram diluídas 1/10, 1/100 e 1/1000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 mol/L pH 9,6 (TCB). O mesmo procedimento foi realizado com a fração solúvel e insolúvel da cultura do pET 28a sem inserto (controle negativo) e as culturas FIVp24 BamHI/HindIII, FIVp17 BamHI/HindIII, FIVp24 NcoI/HindIII, FIVp17 NcoI/HindIII e pET 28a sem inserto tratadas com SDS. Cada orifício da microplaca de ELISA (Nunc-Multisorp ou Maxisorp) foi revestido com 100 µL do antígeno em duplicata. A placa foi deixada para adsorção a 4 °C em câmara úmida durante 16 h. Entre todas as fases da reação, as microplacas foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato (0,01 mol/L  $\text{PO}_4^{--}$ , 0,14 mol/L NaCl pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), a fim de se eliminar o excesso de reagentes da fase imediatamente anterior. Com o objetivo de se eliminar possíveis "ruídos" na reação, as microplacas, após terem sido sensibilizadas com o antígeno, foram recobertas com uma solução de TCB pH 9,6 contendo 10% de leite em pó desnatado (LPD) por 1 h a 37 °C em câmara úmida. O soro de um gato naturalmente infectado pelo FIV foi diluído 1/100 em PBST contendo 10% de LPD (PBSTL) e para evitar que alguma proteína da bactéria ou do vetor que estivesse ligado à microplaca pudesse reagir com o soro, foi realizado bloqueio do soro com as frações solúvel e insolúvel do controle negativo (diluído 1/100 cada) por 30 min a temperatura ambiente. O soro bloqueado (100 µL/ poço) foi aplicado na placa e incubado por 1 h a 37 °C em câmara úmida. Após cinco lavagens, foi colocado o conjugado coelho anti-IgG de gato diluído 1/2000 e a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. Em seguida, foi realizada a etapa de lavagens e adição de 100 µL da solução contendo 2,5 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, 100 µl de tetrametilbenzadina (TMB) a 10 mg/ml (diluído em DMSO) e 10 ml de tampão citrato/acetato 0,1 mol/L e pH 6,0. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente sob agitação suave, a reação enzimática foi então bloqueada pela adição de 50 µl de HCl 2 N. As microplacas foram então lidas

em um leitor de placas de ELISA (Multiskan EX-Labsystems) a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram reportados como absorvância ( $A_{450}$ ) contra um branco onde foi colocado apenas o substrato/cromógeno e o bloqueador enzimático.

#### **4.7.5. Produção das proteínas recombinantes do FIV para a purificação**

Para obter quantidade suficiente para realizar a purificação das proteínas recombinantes, uma colônia isolada de pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII, pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII, pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII em *E. coli* cepa BL21(DE) foram inoculadas em 100 mL de caldo LB com 30 µg/mL de canamicina e incubadas a 37 °C a 220 rpm até atingirem a  $A_{600}$  de 0,5-0,6. A indução foi realizada com IPTG na concentração final de 0,1 mmol/L e as culturas foram incubadas por 16 h a 25 °C numa rotação de 200 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 3000 x g durante 15 min a 4 °C, lavadas 2 vezes em PBS e ressuspensas em tampão de lise a 1/10 do volume da cultura juntamente com 1 mg/mL de lisozima. Foram testados os inibidores de protease PMSF (174 mg/mL), e os coquetéis Protease Inhibitor Mix HP (SERVA Electrophoresis), que contém AEBSF, Aprotinina, E-64 e Leupeptina, e Protease-Inhibitor Mix HP PLUS (Serva Electrophoresis), que contém AEBSF, Bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin A e Phosphoramidon, na concentração recomendada pelo fabricante. As culturas foram incubadas no gelo por 15 min e sonicadas (6 ciclos, 30 seg com intervalo de 1 min, amplitude 20%) para ocorrer a lise da bactéria. Foi realizada centrifugação a 3000 x g durante 15 min a 4 °C e o sobrenadante (fração solúvel) de cada cultura foi filtrado em filtro Millex<sup>®</sup>GP 0,22 µm (Micropore<sup>®</sup>).

#### **4.8. Purificação das proteínas recombinantes do FIV**

A purificação das proteínas recombinantes do FIV, presentes na fração solúvel, foi realizada com a coluna HisTrap<sup>™</sup> HP (GE Healthcare Life Science) que separa as proteínas de interesse por cromatografia de afinidade ao metal

imobilizado (níquel), que tem afinidade pela cauda de histidina presente na porção N' ou C' terminal das proteínas recombinantes.

A purificação foi realizada conforme orientação do fabricante, utilizando como solução de ligação e lavagem o tampão fosfato (20 mmol/L fosfato de sódio pH 7,2, 0,5 mol/L NaCl e 20 mmol/L imidazol) e aplicação da amostra e do gradiente de eluição com seringa. As demais etapas de lavagens e limpeza da coluna foram realizadas com auxílio de bomba peristáltica. A eluição das proteínas recombinantes foi realizada com um aumento gradual da concentração de imidazol, partindo da concentração inicial de 20 mmol/L de imidazol e aumentando a proporção do imidazol 500 mmol/L em 10% a cada 3 mL, obtendo as concentrações finais de 68, 116, 164, 212, 260, 308, 356, 404, 454 e 500 mmol/L de imidazol. Todas as frações eluídas foram coletadas em alíquotas de aproximadamente 1 mL e analisadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), para observar o momento em que ocorreu o pico de saída de proteínas. As frações selecionadas foram analisadas na SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação a 12,5% corado com Coomassie blue.

Após determinar as frações que possuíam as proteínas recombinantes, a concentração de proteínas foi estimada pelo método de BCA (SMITH *et al.*, 1985) em comparação à curva padrão de concentração de albumina sérica bovina (BSA). Nessa etapa também foram adicionados inibidores de proteases PMSF (174 mg/mL), Protease Inhibitor Mix HP (SERVA Electrophoresis), ou Protease-Inhibitor Mix HP PLUS (Serva Electrophoresis).

#### **4.9. Especificidade das proteínas recombinantes do FIV**

As proteínas purificadas foram submetidas à técnica de Western blot, para verificação da especificidade dos antígenos FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C' e FIVp17C' produzidos. Para isso, foi realizada SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e realizada a transferência em membrana de nitrocelulose no aparelho Trans-Blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio Rad®), como recomendado pelo fabricante. Após transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (0,1% Ponceau S e 5% ácido acético glacial) por 10 min e descorada com água ultrapura para visualização das bandas e possibilitar o

corte das tiras. Todas as etapas da reação foram realizadas à temperatura ambiente. As tiras com as proteínas recombinantes purificadas foram bloqueadas por 16 h com TBS (*Tris-Buffered Saline* – 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5) e 150 mmol/L NaCl) contendo 10% de LPD (TBSL). Após 3 lavagens com TBS, foram adicionados o soro de gatos positivo e negativo para infecção pelo FIV, diluídos 1/50 em TBSL. As tiras foram incubadas por 1 h 30 min sob agitação, lavadas 2 vezes por 10 min com TBS e, em seguida, foi colocado o conjugado coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase, diluído 1/200 em TBSL. Após 3 lavagens de 10 min com TBS, foi realizada a adição de 1,5 mL da solução de substrato-cromógeno contendo 50 mL de TBS, 10 mL de metanol, 1 mL de 4-Chloro-1-naphthol a 30 mg/mL (diluído em metanol) e 30 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 5 a 10 min de incubação sob agitação suave, as bandas já foram visualizadas, e a reação enzimática foi então bloqueada com 3 lavagens de 10 min com água ultrapura sob agitação.

#### **4.10. ELISA indireto**

Para realização do ELISA indireto com os antígenos recombinantes foi utilizada a solução de bloqueio com LPD a 10%, incubação por 1 h e diluição de 1/100 dos soros, que demonstraram melhores resultados durante a padronização do ELISA indireto com o antígeno FIVp24/TM realizado anteriormente (TANIWAKI, 2009).

##### **4.10.1. Determinação da concentração dos antígenos**

Para determinar a quantidade ideal de antígeno a ser adsorvido na placa, foram testadas as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 ng/poço dos antígenos recombinantes FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C' e FIVp17 C'. Além disso, também foi testado o peptídeo TM sintético (MQELGCNQNQFFCK-Invitrogen™) nas mesmas concentrações dos antígenos recombinantes.

A reação foi feita em microplaca de ELISA (Nunc-Maxisorp) 96 cavidades com fundo chato, utilizando TCB pH 9,6 como diluente dos antígenos. Cada orifício da microplaca foi revestido com 100 µL do antígeno em duplicata com as diferentes concentrações. A placa foi deixada para

adsorção a 4 °C em câmara úmida por 16 h. Entre todas as fases da reação, as microplacas foram lavadas 5 vezes com PBST. As placas foram bloqueadas com TCB contendo 10% LPD e incubadas a 37 °C por 1 h em câmara úmida. Os soros dos gatos positivo e negativo para infecção pelo FIV foram diluídos 1/100 em PBSTL, sendo aplicado 100 µL/poço e incubado por 1 h a 37 °C em câmara úmida. Após lavagem da microplaca, o conjugado coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase diluído 1/2000 em PBSTL foi incubado em câmara úmida por 1 h a 37 °C. Em seguida, foi adicionada a cada cavidade da microplaca 100 µL da solução de substrato e cromógeno, contendo 2,5 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, 100 µl de TMB a 10 mg/ml (diluído em DMSO) e 10 ml de tampão citrato/acetato (pH 6,0). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente sob agitação suave, a reação enzimática foi bloqueada pela adição de 50 µl de HCl 2N. As microplacas foram lidas em leitor de placas de ELISA (Multiskan EX-Labsystems) a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram reportados como  $A_{450}$  contra um branco onde foi colocado apenas o substrato/cromógeno e o bloqueador enzimático. Para calcular qual melhor quantidade de antígeno, foi realizada uma relação entre a  $A_{450}$  média da duplicata do animal positivo e a  $A_{450}$  média do animal negativo.

#### **4.11. Padronização do ELISA indireto rápido**

Com o intuito de desenvolver um teste rápido para o diagnóstico da infecção pelo FIV, foi realizada a padronização do ELISA indireto rápido, com tempo incubação de 15 min do soro e conjugado. As etapas que necessitaram alteração serão apresentadas a seguir. As demais etapas, como lavagens entre os reagentes, bloqueio da placa, reação enzimática (substrato+cromógeno) e bloqueio da reação enzimática não foram alteradas em relação ao ELISA convencional, sendo realizada como já descrito no item 4.10.1

#### **4.11.1. Teste inicial com todos os antígenos**

No primeiro teste, foram utilizados os antígenos com cauda de histidina na porção N' terminal FIVp24N' e FIVp17N' na concentração ideal padronizada de 50 ng/poço. Além disso, foram utilizados os antígenos FIVp24C', FIVp17C' e FIV24/TM (TANIWAKI, 2009), na concentração de 25 ng/poço, e o peptídeo sintético transmembrana FIV-TM (Invitrogen™) na concentração de 100 ng/poço. A adsorção foi realizada em tira de ELISA (Nunc-Maxisorp), com 8 cavidades em fundo chato, revestido com 100 µL de cada antígeno separadamente. As tiras com antígeno foram deixadas para adsorção a 4 °C em câmara úmida por 16 h. As demais etapas foram realizadas como descrito no item 4.10.1, com exceção do tempo de incubação do soro positivo e do conjugado que passou a ser de apenas 15 min.

#### **4.11.2. Teste de concentração de antígeno e diluição do conjugado**

Para melhorar a reação, foram alteradas as concentrações dos antígenos a serem adsorvidos na placa. Todos os antígenos, FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C', FIVp17C', FIV p24/TM e o peptídeo FIV-TM, foram utilizados separadamente na concentração de 50, 100 e 200 ng/poço. Também, foram testadas as diluições de 1/1000 e 1/500 do conjugado anti-IgG de gato marcado com peroxidase. Os tempos de incubação do "pool" de amostras de soro FIV positivo e negativo (diluição de 1/100) e conjugado foram de 15 min. As demais etapas foram feitas como descrito no item 4.10.1.

#### **4.11.3. Teste de concentração dos antígenos em número de moléculas**

Para conseguir comparar a reatividade dos antígenos foi testada a adsorção na concentração em quantidade equimolar de cada antígeno. Portanto, foi calculado o número aproximado de moléculas de cada antígeno em 1 ng com base na sequência obtida no sequenciamento e utilizando o programa Protein Calculator v3.3, disponível no site <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>. Para isso, foram utilizados os

antígenos FIVp24C', FIVp17C' e FIV p24/TM nas concentrações de aproximadamente  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{12}$  moléculas/poço. O peptídeo FIV-TM foi usado nas concentrações de  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $10 \times 10^{12}$ ,  $20 \times 10^{12}$  e  $35,6 \times 10^{12}$  moléculas/poço. Na tabela 2 podem ser observadas as quantidades de antígenos utilizados na reação.

**TABELA 2:** Comparação do número de moléculas em relação massa (ng) de cada antígeno

| Nº moléculas          | FIVp17C' | FIVp24C' | FIVp24/TM | FIV-TM  |
|-----------------------|----------|----------|-----------|---------|
| $1 \times 10^{12}$    | 26,8 ng  | 44 ng    | 49,5 ng   | 2,8 ng  |
| $2 \times 10^{12}$    | 54,15 ng | 89 ng    | 100 ng    | 5,7 ng  |
| $4 \times 10^{12}$    | 107,2 ng | 176,2 ng | 198 ng    | 11,3 ng |
| $10 \times 10^{12}$   | -        | -        | -         | 28,1 ng |
| $20 \times 10^{12}$   | -        | -        | -         | 56,2 ng |
| $35,6 \times 10^{12}$ | -        | -        | -         | 100 ng  |

Foi utilizado “pool” de amostras de soros positivo e negativo na diluição 1/100 e conjugado anti-IgG de gato marcado com peroxidase na diluição 1/1000, com tempo de incubação de 15 min. As demais etapas foram realizadas como descrito no item 4.10.1.

#### 4.12. ELISA indireto rápido

##### 4.12.1. Processamento das amostras

Os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM foram utilizados, separadamente, na concentração de  $2 \times 10^{12}$  moléculas/poço. A reação foi realizada em microplaca de ELISA (Nunc-Maxisorp) 96 cavidades com fundo chato, utilizando TCB pH 9,6 como diluente dos antígenos. Cada orifício da microplaca foi revestido com 100 µL de cada antígeno na concentração já determinada. A placa foi deixada para adsorção a 4 °C em câmara úmida por 16 hs. Entre todas as fases da reação, as microplacas foram

lavadas 5 vezes com PBST. As placas foram bloqueadas com TCB contendo 10% LPD e incubadas a 37 °C por 1 h em câmara úmida. Os soros dos gatos a serem testados, assim como o “pool” de soros positivos e negativos para a infecção pelo FIV foram diluídos 1/100 em PBSTL, aplicados na placa (100 µL/poço) e incubados por 15 min a 37 °C em câmara úmida. Após lavagem da microplaca, o conjugado coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase diluído 1/1000 em PBSTL foi incubado em câmara úmida por 15 min a 37 °C. Em seguida, foi adicionada a cada cavidade da microplaca 100 µL da solução de substrato e cromógeno, contendo 2,5 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, 100 µl de TMB a 10 mg/ml (diluído em DMSO) e 10 ml de tampão citrato/acetato (pH 6,0). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente sob agitação suave, a reação enzimática foi então bloqueada pela adição de 50 µl de HCl 2 N. As microplacas foram lidas em leitor de placas de ELISA (Multiskan EX-Labsystems) a um comprimento de onda de 450 nm.

Os resultados foram reportados como  $A_{450}$  contra um branco onde foi colocado somente o substrato/cromógeno e o bloqueador enzimático, e em índice ELISA ( $IE = (A_{450} \text{ da amostra} - A_{450} \text{ do controle negativo}) / (A_{450} \text{ do controle positivo} - A_{450} \text{ do controle negativo})$ ). O valor do ponto de corte foi calculado como a média das amostras negativas mais 3 a 7 desvios padrão. A determinação da sensibilidade e especificidade relativa do ELISA utilizando cada um dos antígenos foi realizada em relação ao SNAP® FIV/FeLV Combo test (IDEXX laboratories). Além disso, também foi realizado o teste *kappa* ( $k = (\text{concordância observada} - \text{concordância aleatória}) / (\text{concordância máxima} - \text{concordância aleatória})$ ) para verificar a concordância entre os métodos diagnósticos avaliados.

#### **4.13. ELISA indireto rápido para uso comercial**

##### **4.13.1. Titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato**

Num kit comercial de ELISA é necessário um controle positivo de reação, principalmente para ter certeza de que todos os reagentes (antígenos, conjugado, substrato/cromógeno, bloqueador de reação e solução de lavagem)

estão bem conservados e ainda produzem um bom sinal. Com esse intuito, foi realizada a titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato purificada para determinar a quantidade ideal para ser usada na adsorção. A concentração da IgG estimada pelo método de BCA (SMITH *et al.*, 1985) em comparação à curva padrão de concentração de BSA foi de 20 mg/mL. Na titulação foram utilizadas as concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 ng de IgG anti-gato por poço. A reação foi realizada como padronizada no ELISA indireto rápido (item 4.12.1) utilizando “pool” de soros de gatos FIV negativos diluído 1/100.

#### **4.13.2. Armazenamento das microtiras de ELISA**

As tiras de ELISA com os antígenos adsorvidos devem ser avaliadas quanto ao seu tempo de armazenamento, sem alteração da sensibilidade do teste. Para testar métodos de conservação das tiras, a IgG de coelho anti-IgG de gato purificada nas concentrações de 100, 50 e 25 ng/poço foi adsorvida e a reação foi realizada conforme padronização do ELISA indireto rápido, com exceção dos procedimentos de lavagem. Num primeiro momento, todas as etapas de lavagem foram realizadas com PBST com 0,1% de azida sódica. Posteriormente, apenas a lavagem após o bloqueio com TCB contendo 10% LPD, foi realizado com o PBST com 0,1% de azida sódica e 0,01% de timerosal e o restante das lavagens foi realizada com PBST sem conservantes. Para ter certeza da vantagem do uso dos conservantes foi testada em conjunto uma tira com lavagem apenas com PBST. Além disso, foi realizado teste de secagem das tiras com incubação de 1 h a 37 °C ou secagem na geladeira (4 a 8 °C) durante 16 a 18 h após o bloqueio. A reação foi realizada com soro de gato FIV negativo na diluição de 1/100 e conjugado diluído 1/1000.

Após a determinação do melhor método de secagem, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado com intervalo de 10 dias de armazenamento em geladeira, para a verificação da manutenção da viabilidade do antígeno.

#### **4.14. Validação do ELISA indireto rápido com antígeno FIVp24/TM**

##### **4.14.1. Tempo de manutenção da reatividade dos antígenos**

Para avaliar a manutenção da reatividade dos antígenos, as microtiras de ELISA (Nunc-Maxisorp) de 8 cavidades com fundo chato foram revestidas com 100 µL de antígeno FIVp24/TM ou IgG de coelho anti-IgG de gato na concentração de 100 ng/poço utilizando como diluente o TCB pH 9,6. A adsorção foi realizada em câmara úmida a 4 °C por 16 h. Entre todas as fases da reação, as microtiras foram lavadas 5 vezes com PBST. As microtiras foram bloqueadas com TCB contendo 10% LPD com ou sem o coquetel de inibidores de protease (Sigma FAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA free – Sigma Aldrich), na concentração recomendada pelo fabricante, e incubadas a 37 °C por 1 h em câmara úmida. Após lavagem com PBST e secagem a 4 °C, todas as tiras foram seladas e mantidas a 4 °C até o momento do uso.

As tiras de ELISA foram submetidas ao teste de tempo de conservação da reatividade dos antígenos mensalmente durante 10 meses. Em cada momento, 100 µL dos soros diluídos 1/100 em PBSTL, em duplicata, foram incubados por 15 min a 37 °C em câmara úmida. Na reação com o antígeno FIVp24/TM, foi utilizado “pool” de soros positivos e negativos para a infecção pelo FIV, como controles positivo e negativo de reação, respectivamente. Na reação com IgG de coelho anti-IgG de gato, o “pool” de soros negativos para a infecção pelo FIV foi usado como controle positivo e o soro de um cão foi utilizado como controle negativo. O restante da reação foi realizado conforme descrito no item 4.12.1.

##### **4.14.2. Determinação da repetibilidade do ELISA indireto com antígeno FIVp24/TM**

O controle de qualidade interna do ELISA indireto rápido com o antígeno FIVp24/TM foi demonstrado pela avaliação da repetibilidade do teste. As reações foram realizadas como descritas no item 4.14.1, apenas com o antígeno FIVp24/TM. Uma amostra FIV positiva foi diluída 1/5, 1/10 e 1/15 em PBS para verificar o desempenho do teste frente a diferentes concentrações de

anticorpos. Para a avaliação da repetibilidade ou precisão intra-teste (dentro de uma mesma corrida), foram testadas 14 replicatas da amostra FIV positiva pura e suas diluições num mesmo momento. Para a avaliação da repetibilidade inter-teste (entre corridas diferentes) as mesmas amostras foram testadas em duplicata em cinco ocasiões diferentes. O coeficiente de variação (CV) foi calculado utilizando o desvio padrão (DP) e a  $A_{450}$  média das repetições ( $\bar{x}$ ), com a fórmula  $CV(\%) = (DP \times 100) / \bar{x}$ .

#### **4.15. Padronização do Western blot com proteínas recombinantes do FIV**

A confirmação da especificidade de cada antígeno recombinante do FIV usado na reação de ELISA indireto foi realizada pela técnica de Western blot logo após a produção dos antígenos. Mas para facilitar o diagnóstico e confirmar que os gatos possuem reatividade distinta contra cada antígeno, foi desenvolvida uma técnica de Western blot com os diferentes antígenos recombinantes produzidos.

##### **4.15.1. Produção e purificação da proteína FIVp24/TM**

A proteína FIVp24/TM apesar de ter uma ótima reatividade no ELISA indireto, ao realizar o Western blot apresentava sinais de degradação (TANIWAKI, 2009). Isso não prejudica o seu uso como antígeno no ELISA, uma vez que continua altamente específico e sensível, no entanto prejudica o seu uso na técnica de Western blot, pois há visualização de várias bandas de tamanho menor, que apesar de específicas podem coincidir com o tamanho da proteína p24 sozinha. Por isso, foi realizada nova produção do antígeno FIVp24/TM para o uso nessa técnica, seguindo protocolo descrito por Taniwaki (2009) com pequenas modificações.

O mesmo procedimento de expressão foi realizado com a *E. coli* cepa BL21(DE) contendo o pET28a-FIVp24/TM, como já descrito no item 4.7.5, no entanto com a temperatura de indução de 30 °C e o uso do coquetel de inibidores de protease Sigma FAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA free (Sigma Aldrich) durante a lise celular. A proteína FIVp24/TM é produzida

em corpúsculos de inclusão (fração insolúvel), portanto a fração solúvel foi separada e o *pellet* foi ressuspenso em solução desnaturante (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Imidazol e 8 mol/L de ureia), também a 1/10 do volume inicial da cultura, com presença de coquetel de inibidores de protease. Foi realizada centrifugação a 3000 x g durante 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millex® GP 0,22 µm (Millipore®).

A purificação da proteína FIVp24/TM, presente na fração insolúvel foi realizada como descrito no item 4.8, uma vez que possui cauda de histidina na porção N' terminal. As frações selecionadas foram analisadas na SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação a 12,5% ou 20% e corado com Coomassie blue. A especificidade da proteína FIVp24/TM foi testada como descrito no item 4.9. A concentração de proteína FIVp24/TM foi estimada pelo método de BCA (SMITH *et al.*, 1985) em comparação à curva padrão de concentração de BSA.

#### 4.15.2. SDS-PAGE com Tris-Glicina

Protocolos de SDS-PAGE com géis de separação de 12,5%, 15%, 20% e gradiente de 15 a 18% foram utilizados, conforme descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes utilizando a cuba de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad) com uma voltagem de 80 a 100 V, por aproximadamente 1 h e 30 min no gel de 12,5%, e 2 h e 30 min a 3 h nos demais géis. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie blue. Alguns géis foram incubados por 30 min numa solução de 40% metanol e 10% de ácido acético, para a fixação de peptídeos antes da coloração de Coomassie blue.

Foram testadas as proteínas recombinantes FIVp17C', FIVp24C' e FIVp24N', e o peptídeo sintético FIV-TM (Invitrogen™). As proteínas e o peptídeo foram testados separadamente e num mesmo poço. Inicialmente as proteínas foram avaliadas quanto à viabilidade do seu uso, principalmente pela presença ou ausência de degradação e presença de quantidade suficiente para a transferência. O peptídeo FIV-TM foi testado nas concentrações de 1, 2, 4 e 6 µg/poço.

#### **4.15.3. SDS-PAGE com Tris-Tricina**

Para melhorar a resolução de proteínas pequenas, foi utilizado o protocolo descrito por Schagger (2006) com condições desnaturantes. Seguindo o protocolo recomendado, foram testados os géis de separação a 16% com ou sem ureia, e ambos com 1 cm de gel de espaçamento a 10% entre o gel de separação e o gel de empilhamento a 4% (SCHÄGGER, 2006). As amostras testadas foram o peptídeo FIV-TM (2 µg), e as proteínas recombinantes FIVp17C'(1,1 µg), FIVp24C'(1,2 µg) e FIVp24/TM (0,5 µg), todos em um mesmo poço. As proteínas foram tratadas com o tampão de amostra descrito por Laemmli (1970), por 8 min a 60 °C. A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes utilizando a cuba de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad). A voltagem foi mantida a 30 V até a amostra entrar no gel (aproximadamente 30 min) e em seguida a 80 V por aproximadamente 2 h. Após a eletroforese, os géis foram fixados com solução de fixação de peptídeos (40% de metanol, 10% de ácido acético) e corados com Coomassie blue.

#### **4.15.4. Transferência para a membrana de nitrocelulose**

Durante a padronização da técnica de transferência das proteínas recombinantes e do peptídeo sintético, foram utilizadas membranas de nitrocelulose de porosidade de 0,1 µm e 0,22 µm (Protran™ – Whatman). Também foi utilizado tampão de transferência (15,6 mM Tris-HCl, 120 mM Glicina, pH 8,1-8,4) com ou sem 20% de metanol, na tentativa de melhorar a eficiência de transferência. Todos os géis de SDS-PAGE, tanto de Tris-Glicina como Tris-Tricina, foram feitos em duplicata, portanto um foi submetido à coloração por Coomassie blue e outro à transferência no aparelho Trans-Blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio Rad®), como recomendado pelo fabricante. A transferência foi realizada a 10 ou 15 V, por 30 a 45 min.

A eficiência de transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi verificada através da visualização do Marcador Kaleidoscope Polypeptide Standards (Bio-Rad®) ou Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®), e principalmente pela reação de Western blot. A reação

de Western blot foi realizada como descrito no item 4.9, mas com a diluição de 1/50 ou 1/100 dos soros de gatos positivos ou “pool” de soros positivos para infecção pelo FIV.

#### **4.16. Western blot das amostras**

Após padronização da técnica de SDS-PAGE e transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, foi realizada o processamento de amostras de soros de gatos. Para esta etapa, foi realizada a SDS-PAGE de Tris-Tricina com gel de separação a 16% (SCHÄGGER, 2006), utilizando condições desnaturantes e a cuba de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad) com um pente preparativo. As proteínas recombinantes FIVp24/TM (10 µg), FIVp24C' (9 µg), FIVp17C' (10 µg) e o peptídeo FIV-TM (30µg) foram submetidos à fervura por 5 min com tampão de amostra (LAEMMLI, 1970) num mesmo tubo. Não foi possível aplicar todo o volume de antígenos de uma só vez, por isso, a aplicação foi realizada em duas etapas, com uma corrida de 15 min a 30 V entre as aplicações, apenas para iniciar a entrada dos antígenos no gel. A eletroforese foi realizada inicialmente com 30 V por 25 min, até a entrada de todo o volume de antígenos no gel de empilhamento, seguida de aproximadamente 3 h de corrida a 80 V. O gel foi incubado por 20 min no tampão de transferência antes de ser submetido à transferência para a membrana de nitrocelulose 0,1 µm (Protran™ – Whatman), no aparelho Trans-Blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio Rad®), como recomendado pelo fabricante. A transferência foi realizada por 45 min a 15 V, seguida de bloqueio da membrana com TBS (pH 7,5) contendo 10% de LPD por 16 h em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com TBS, a membrana foi cortada manualmente em tiras de aproximadamente 0,5 cm, com auxílio de bisturi e régua. As tiras não utilizadas no momento, foram submetidas à secagem em temperatura ambiente em papel toalha e armazenadas a 4 °C até o momento do uso.

Para a reação de Western blot foram selecionados 18 soros ou plasmas de gatos positivos ou negativos para a infecção pelo FIV, previamente testados pelo SNAP® FIV/FelV Combo test (IDEXX laboratories) e pelo ELISA indireto rápido com os antígenos recombinantes. Para verificar a especificidade analítica dos antígenos produzidos foram utilizados 3 soros positivos apenas

para a infecção pelo FeLV. Além disso, no momento da seleção das amostras foi levada em consideração a reatividade do soro no ELISA indireto com os diferentes antígenos. As amostras foram diluídas 1/100 em TBSL e as tiras foram incubadas por 1 h e 30 min sob agitação. Após 2 lavagens de 10 min com TBS, foi colocado o conjugado coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase, diluído 1/200 em TBSL. As tiras foram novamente incubadas por 1 h 30 min sob agitação. Após 3 lavagens de 10 min com TBS, foi realizada a adição da solução de substrato-cromógeno contendo 50 mL de TBS, 10 mL de metanol, 1 mL de 4-Chloro-1-naphthol a 30 mg/mL (diluído em metanol) e 30 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 10 min de incubação sob agitação suave a reação enzimática foi então bloqueada com 3 lavagens de 10 min com água ultrapura sob agitação. Todas as etapas da reação foram realizadas em temperatura ambiente.

Todas as amostras positivas no ELISA indireto foram submetidas ao Western blot para a confirmação da positividade.

## 5. RESULTADOS

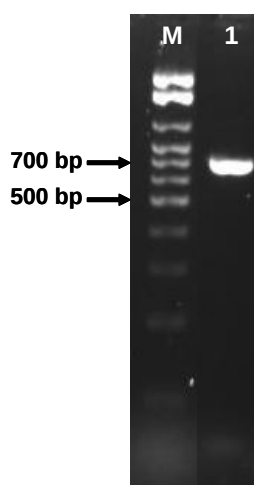
### 5.1. Amostras

Das amostras de soros ou plasma testados com o SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test (IDEXX laboratories), 38,6% (44/114) foram negativas tanto para a infecção pelo FIV quanto para FeLV e 5,3 % (6/114) apresentaram coinfeção. Quarenta e quatro amostras (38,6%) foram positivas apenas para a infecção pelo FIV e 20 amostras (17,5%) foram positivas apenas para a infecção pelo FeLV. Dessas amostras 110 foram utilizadas para o ELISA indireto rápido e 18 para o Western blot.

### 5.2. Amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17 do FIV

#### 5.2.1. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal

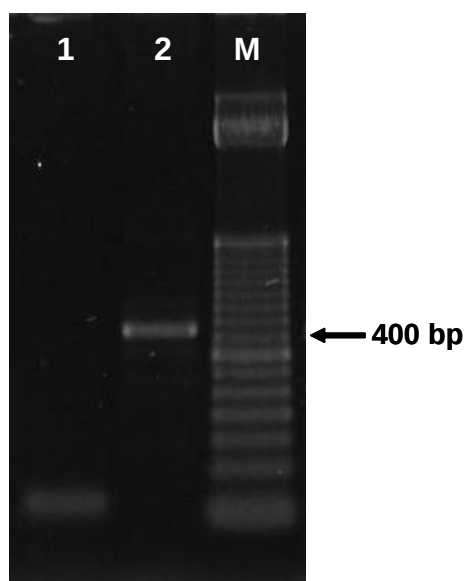
A amplificação do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII pode ser observada na Figura 7, onde verifica-se banda única correspondente ao fragmento esperado de aproximadamente 684 bp em comparação com o marcador de tamanho molecular.



**FIGURA 7:** Amplificação do fragmento de DNA que codifica o antígeno de capsídeo (FIVp24 BamHI/HindIII). M: Marcador de tamanho molecular 100 bp (LowRanger 100 bp DNA ladder-Norgen<sup>®</sup>); Coluna 1: Fragmento esperado de aproximadamente 684 bp.

### 5.2.2. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina N' terminal

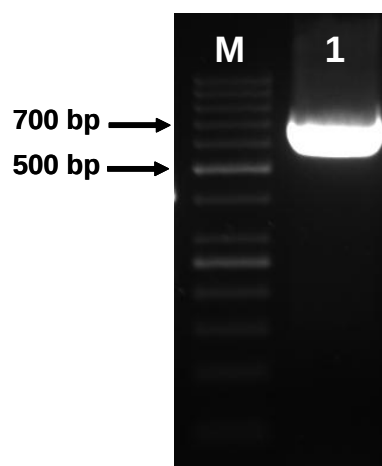
A amplificação do fragmento p17 BamHI/HindIII foi demonstrada pela visualização de produto da PCR de tamanho desejado de aproximadamente 425 bp (Figura 8). Observa-se que a amostra do animal Camp (coluna 1) não amplificou, enquanto que a amplificação da amostra do animal Pequeno (coluna 2) apresentou banda única do tamanho esperado utilizando a técnica de *Touchdown* PCR.



**FIGURA 8:** Amplificação do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII. Coluna 1 e 2: produto de amplificação dos gatos Camp e Pequeno, respectivamente; M: Marcador de tamanho molecular 50 bp DNA Ladder (Invitrogen™).

### 5.2.3. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p24 do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal

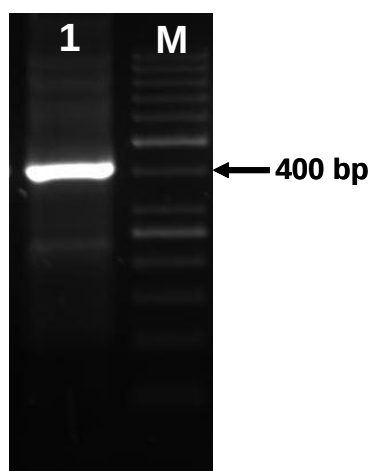
A amplificação do fragmento FIVp24 NcoI/HindIII, que codifica a proteína de capsídeo do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal, pode ser observada na figura 9, onde verifica-se banda única correspondente ao fragmento esperado de aproximadamente 690 bp em comparação com o marcador de tamanho molecular.



**FIGURA 9:** Amplificação do fragmento FIVp24 NcoI/HindIII. M: Marcador de tamanho molecular 50 bp (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder - Fermentas®); coluna 1: Fragmento esperado se aproximadamente 690 bp.

#### 5.2.4. Amplificação do fragmento que codifica a proteína p17 do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal

A amplificação do fragmento p17 C' NcoI/HindIII, que codifica a proteína de matriz do FIV em fase com a cauda de histidina C' terminal, pode ser observada na figura 10, onde visualiza-se banda correspondente ao fragmento esperado de aproximadamente 420 bp em comparação com o marcador de tamanho molecular.



**FIGURA 10:** Amplificação do fragmento FIVp17 NcoI/HindIII. Coluna 1: Fragmento esperado se aproximadamente 420 bp; M: Marcador de tamanho molecular 50 bp (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder - Fermentas®).

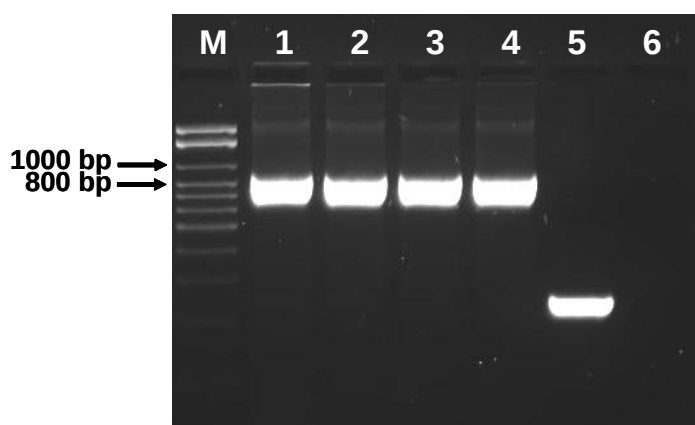
### 5.3. Clonagem dos fragmentos que codificam as proteínas p24 e p17 do FIV

#### 5.3.1. Clonagem do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII

A clonagem direta do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII no vetor de expressão não foi possível. Foram realizadas 4 tentativas de clonagem com alteração nas concentrações de vetor e inserto, e com inserto oriundo de digestão dupla (as 2 enzimas ao mesmo tempo) ou individual em duas fases (primeiro com *Bam*HI e após purificação nova digestão com *Hind*III, e vice-versa), mas nenhuma obteve sucesso (dados não mostrados). Por isso, foi realizada a clonagem inicial no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega<sup>®</sup>) e posterior clonagem no vetor de expressão.

##### 5.3.1.1. Clonagem inicial no plasmídeo pGEM-T Easy

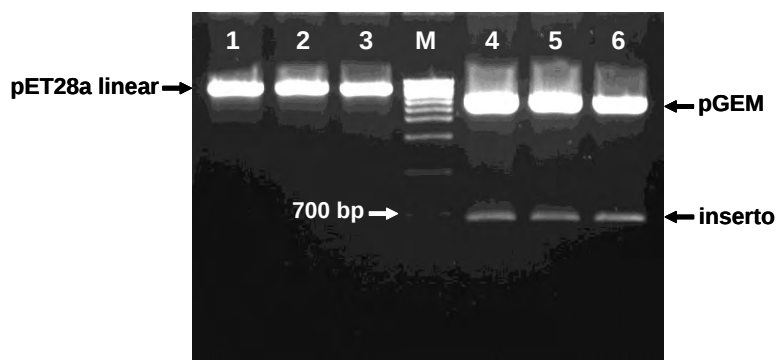
O fragmento FIVp24 BamHI/HindIII foi inicialmente clonado no vetor pGEM-T Easy Vector. A seleção foi realizada pela PCR com *primers* pGEM e os clones positivos apresentaram banda esperada de aproximadamente 935 bp (Figura 11). Dois clones, denominados pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII clone 7 e 8, foram selecionados e seus plasmídeos recombinantes extraídos.



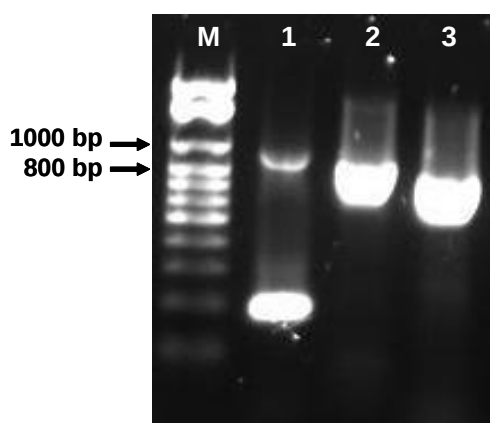
**FIGURA 11:** PCR das colônias para seleção dos clones pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII. M: Marcador de tamanho molecular 100 bp (LowRanger 100 bp DNA ladder-Norgen<sup>®</sup>); colunas 1 a 4: reações positivas com banda esperada de aproximadamente 935 bp; coluna 5: pGEM fechado (sem inserto); coluna 6: controle negativo.

### 5.3.1.2. Subclonagem no vetor de expressão pET 28a

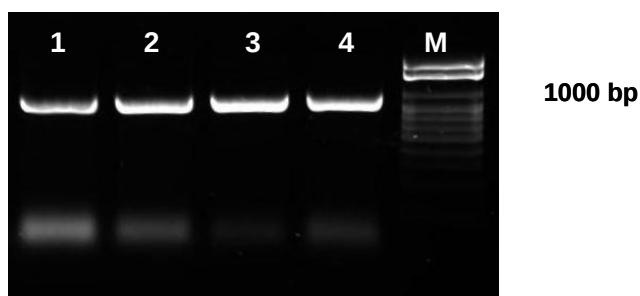
A digestão dos plasmídeos recombinantes pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII (clones 7 e 8) e do vetor pET 28a com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III pode ser observada na figura 12, onde nota-se a linearização do pET28a e a liberação de um inserto esperado de aproximadamente 684 bp relativo ao fragmento FIVp24 BamHI/HindIII. Após a purificação e quantificação dos fragmentos foi realizada a reação de ligação, que foi confirmada pela PCR (Figura 13). Dois clones, denominados pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII clone 7-1 e 8-1, com tamanho esperado de aproximadamente 987 bp foram selecionados pela PCR das colônias (Figura 14).



**FIGURA 12:** Digestão do plasmídeo pET28a e plasmídeo recombinante pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Colunas 1, 2 e 3: plasmídeo pET28a linear; Colunas 4, 5 e 6: pGEM-FIVp24 BamHI/HindIII digerido com banda que corresponde ao plasmídeo pGEM-T Easy e o inserto FIVp24 BamHI/HindIII; M: marcador de tamanho molecular: HighRanger 1 kb DNA ladder (Norgen®).



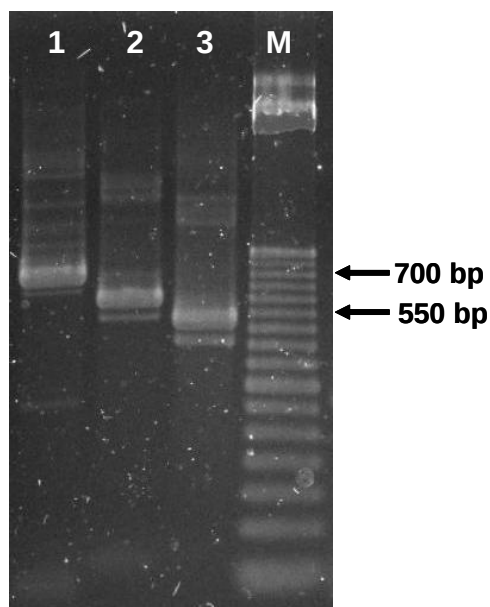
**FIGURA 13:** PCR da reação de ligação do plasmídeo pET28a e do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII. M: Marcador de tamanho molecular 100 bp (LowRanger 100 bp DNA ladder-Norgen®); Coluna 1: reação pET-T7pro e pET-T7ter; Coluna 2: reação pET-T7 pro e FIVp24N'/Rev-HindIII; Coluna 3: reação FIVp24N'/Fw-BamHI e pET-T7ter. Bandas com tamanho esperado de aproximadamente 987, 872 e 798 bp, respectivamente.



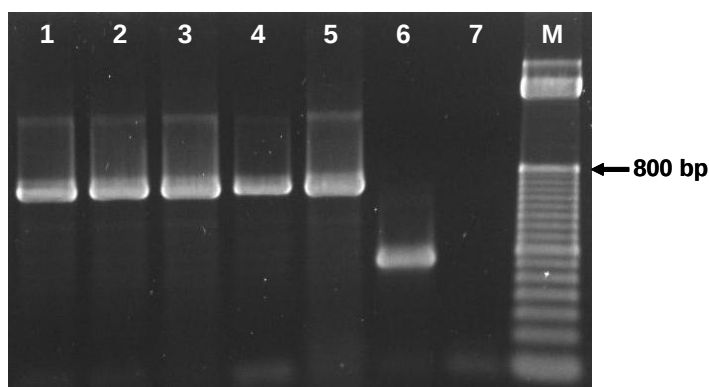
**FIGURA 14:** PCR das colônias para seleção dos clones pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII. Colunas 1 a 4: reações positivas; M: Marcador de tamanho molecular 100 bp (LowRanger 100 bp DNA ladder-Norgen®). Banda esperada de aproximadamente 987 bp.

### 5.3.2. Clonagem do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII

A correta ligação do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII com o vetor pET28a digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III foi confirmada pela PCR (Figura 15). A seleção dos clones positivos foi realizada pela observação de produto de tamanho esperado de aproximadamente 727 bp (Figura 16). Dois clones positivos pela PCR, denominados pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII clone 1 e 3, tiveram seus plasmídeos extraídos.



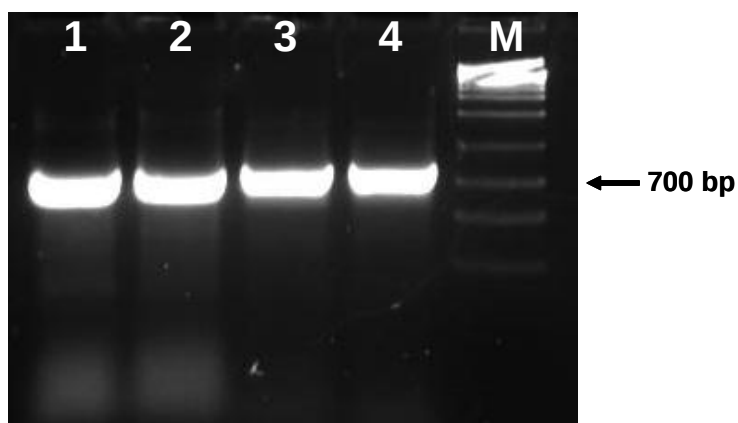
**FIGURA 15:** PCR da reação de ligação do plasmídeo pET28a e do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII. Coluna 1: reação pET-T7pro e pET-T7ter; Coluna 2: reação pET-T7 pro e FIVp17N'/Rev-HindIII; Coluna 3: reação FIVp17N'/Fw-BamHI e pET-T7ter; M: Marcador de tamanho molecular 50 bp DNA Ladder (Invitrogen™). Bandas com tamanho esperado de aproximadamente 727, 613 e 539 bp, respectivamente.



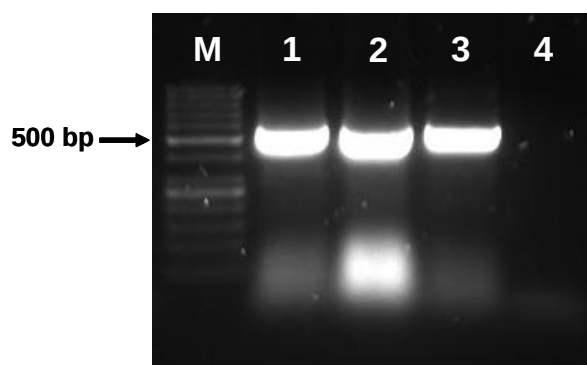
**FIGURA 16:** PCR das colônias para seleção dos clones pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII. Coluna 1 a 5: reações positivas (produto esperado de aproximadamente 727 bp); coluna 6: pET28a fechado (sem inserto); coluna 7: controle negativo; M: Marcador de tamanho molecular 50 bp DNA Ladder (Invitrogen™).

### 5.3.3. Clonagem dos fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII

A seleção dos clones positivos dos fragmentos FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII digeridos com as enzimas *NcoI* e *HindIII* inseridos no vetor pET28a foi realizada pela observação de produtos de PCR de tamanho esperado de aproximadamente 872 (Figura 17) e 602 bp (Figura 18), respectivamente. Os produtos de PCR positivos, dos clones denominados pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII clone 1, 2, 4 e 5, e pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII clone 2, 4 e 5, foram purificados e submetidos ao seqüenciamento.



**FIGURA 17:.** PCR das colônias para seleção dos clones pET-FIVp24 NcoI/HindIII. Colunas 1 a 4: reações positivas (aproximadamente 872 bp) dos clones 1, 2, 4 e 5, respectivamente; M: Marcador GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas®).



**FIGURA 18:** PCR das colônias para seleção dos clones pET-FIVp17 NcoI/HindIII. M: Marcador GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas®); Colunas 1 a 3: reações positivas (aproximadamente 602 bp) dos clones 2, 4 e 5, respectivamente; Coluna 4: controle negativo.

#### 5.4. Sequenciamento

O sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII clones 7-1 e 8-1 e pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII clones 1 e 3, assim como dos produtos de PCR dos clones 2, 4 e 5 do pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII e clones 1, 2, 4 e 5 do pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII, confirmou a correta inserção do fragmento e a fase de leitura de tradução dos clones e da cauda de histidina. Após análise das sequências foram selecionados os plasmídeos pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII clone 7-1, pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII clone 3, pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII clone 4 e pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII clone 4. As porcentagens de identidade das sequências de aminoácidos codificados pelos plasmídeos recombinantes escolhidos para a produção das proteínas do FIV em comparação com os isolados de referência estão apresentados na tabela 3.

**TABELA 3:** Valores de identidade de aminoácidos das proteínas recombinantes do FIV em comparação com isolados de referência.

| Isolados (subtipo) | FIVp24N' | FIVp24C' | FIVp17N' | FIVp17C' | Nº acesso |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Petaluma (A)       | 94,6%    | 94,6%    | 88,1%    | 88,1%    | M25381    |
| TM-2 (B)           | 98,6%    | 98,6%    | 96,2%    | 96,2%    | M59418    |
| BM3070 (C)         | 91,9%    | 91,9%    | 86,6%    | 86,6%    | AF474246  |
| Shizuoka (D)       | 96,4%    | 96,4%    | 84,4%    | 85,1%    | AY679785  |

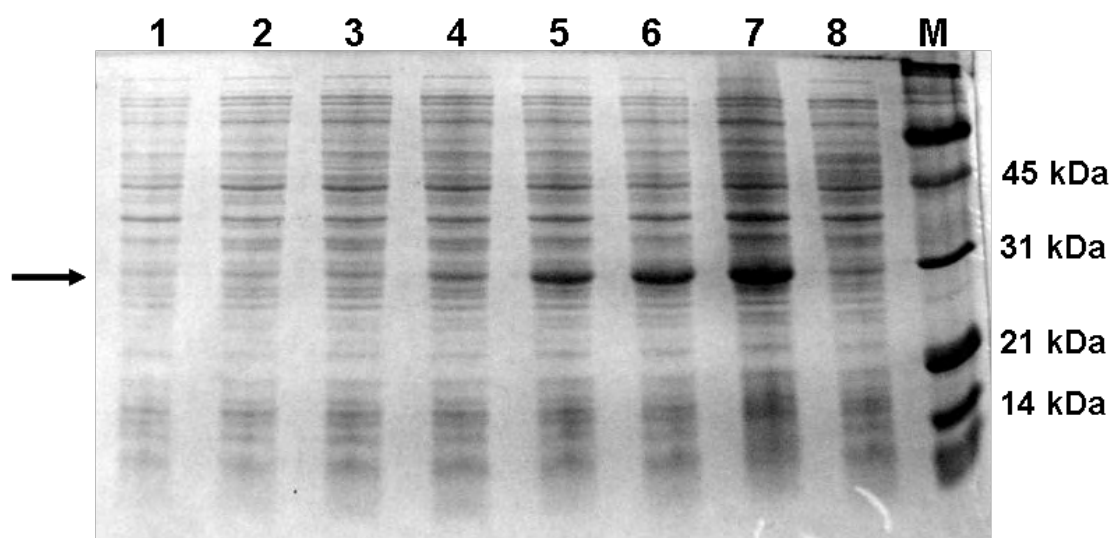
## **5.5. Produção das proteínas recombinantes do FIV**

### **5.5.1. Determinação do tempo de incubação após indução**

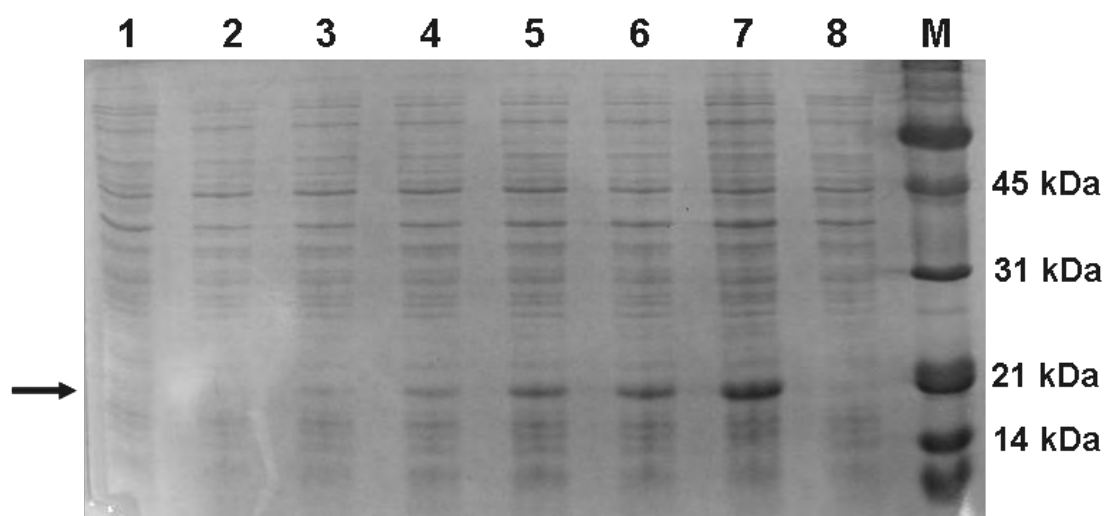
A produção das proteínas recombinantes FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C' e FIVp17C' foi confirmada pela presença de banda na altura esperada de aproximadamente 28,3 (Figura 19), 18,3 (Figura 20), 26,4 (Figura 21) e 16,4 kDa (Figura 22) respectivamente, pela análise das alíquotas em SDS-PAGE. Nessas figuras, a presença das proteínas recombinantes já pode ser observada no momento 1 h após indução com IPTG, e existe um aumento gradual da quantidade de proteína estimada até o momento 3 e 16 h. Portanto, pela facilidade e presença de maior quantidade de proteínas, nas induções em larga escala foi utilizada a incubação de 16 h.

### **5.5.2. Determinação da solubilidade das proteínas recombinantes FIVp24N', FIVp17N', FIVp24C'e FIVp17C'**

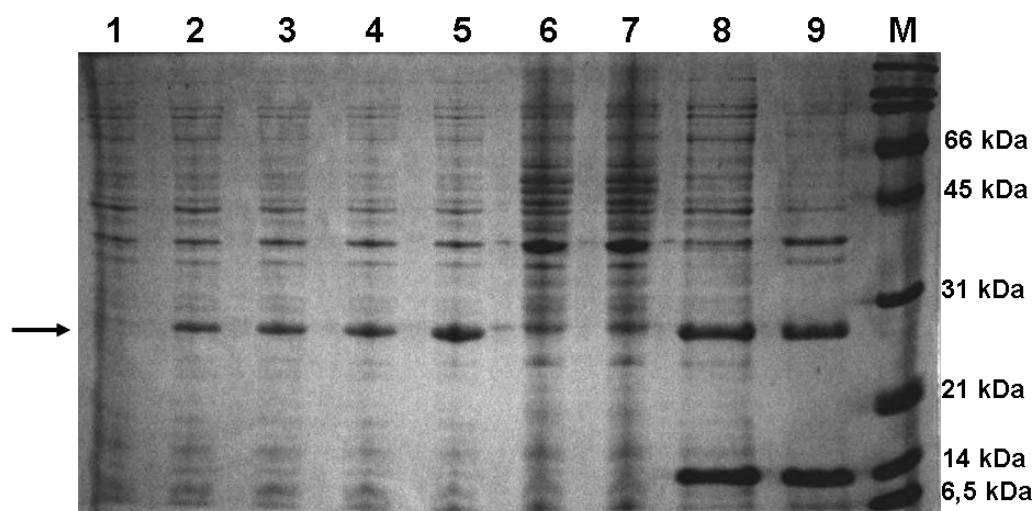
Na SDS-PAGE as proteínas FIVp24N' (Figura 23) e FIVp17N' (Figura 24), podem ser observadas em grande quantidade na fração insolúvel, no entanto uma banda pode ser observada também na fração solúvel da cultura FIVp24 BamHI/HindIII. Já na SDS-PAGE da proteína FIVp17C' (Figura 22) pode ser observada em maior quantidade na fração solúvel, enquanto que a proteína FIVp24 C' (Figura 21), pode ser observada em grande quantidade tanto na fração solúvel quanto na insolúvel. Por isso, para a verificação de antigenicidade das quatro proteínas recombinantes foram testadas tanto a fração solúvel como a insolúvel.



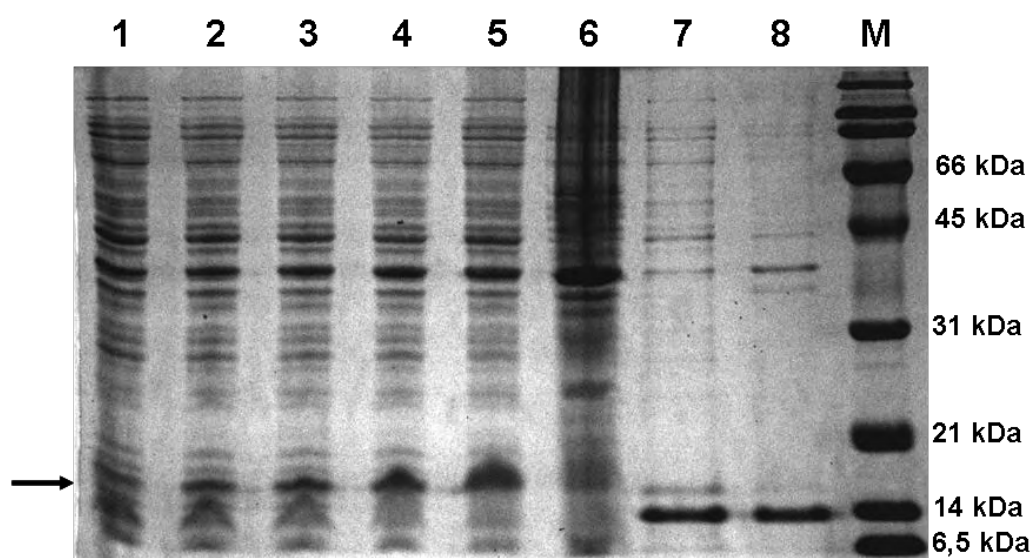
**FIGURA 19:** SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação da cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII após indução. Coluna 1: controle negativo (pET28a fechado) no momento 3 h. Colunas 2 a 7: cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII induzido com 0,1 mmol/L de IPTG, nos momentos 0, 30 min, 1, 2, 3 e 16 h, respectivamente. Nas colunas 4 a 7 observa-se presença de banda esperada de aproximadamente 28,3 kDa (seta). Coluna 8: cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII sem indução no momento 3 h. M: Marcador: SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.



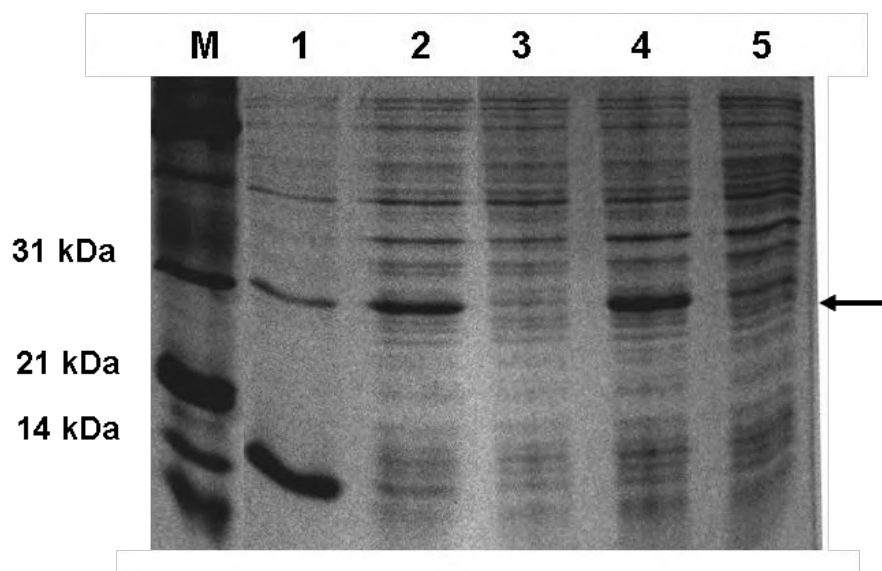
**FIGURA 20:** SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação da cultura pET28a-FIVp15 BamHI/HindIII após indução. Coluna 1: controle negativo (pET28a fechado) no momento 3 h. Colunas 2 a 7: cultura pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII induzido com 0,1 mmol/L de IPTG, nos momentos 0, 30 min, 1, 2, 3 e 16 h, respectivamente. Nas colunas 4 a 7 observa-se presença de banda esperada de aproximadamente 18,3 kDa (seta). Coluna 8: cultura pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII sem indução no momento 3 h. Coluna 9: Marcador: SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.



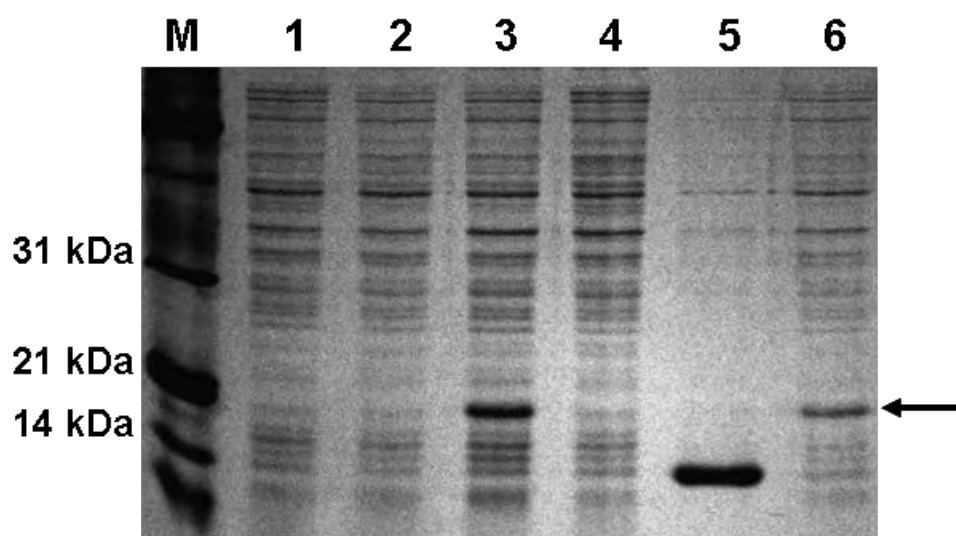
**FIGURA 21:** SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação após indução da cultura pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII. Colunas 1 a 5: cultura pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII induzida com 0,1 mmol/L de IPTG, nos momentos 0, 1, 2, 3 e 16 h, respectivamente. Coluna 6 e 7: cultura pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII sem indução no momento 16 h. Coluna 8 e 9: fração solúvel e insolúvel da cultura pET28a-FIVp24 NcoI/HindIII, respectivamente. M: Marcador: SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). A seta indica presença de banda esperada de aproximadamente 26,4 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.



**FIGURA 22:** SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação após indução da cultura pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII. Colunas 1 a 5: cultura pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII induzida com 0,1 mmol/L de IPTG, nos momentos 0, 1, 2, 3 e 16 h, respectivamente. Coluna 6: cultura pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII sem indução no momento 16 h. Coluna 7 e 8: fração solúvel e insolúvel da cultura pET28a-FIVp17 NcoI/HindIII, respectivamente. M: Marcador: SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). A seta indica presença de banda esperada de aproximadamente 16,4 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.



**FIGURA 23:** SDS-PAGE da determinação da solubilidade da proteína FIVp24N'. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®); Coluna 1 e 2: fração solúvel e insolúvel da cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII, respectivamente; Colunas 3 e 4: cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII induzida nos momentos 0 e 3 h, respectivamente; Coluna 5: cultura pET28a-FIVp24 BamHI/HindIII não induzida. A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de 28,3 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.

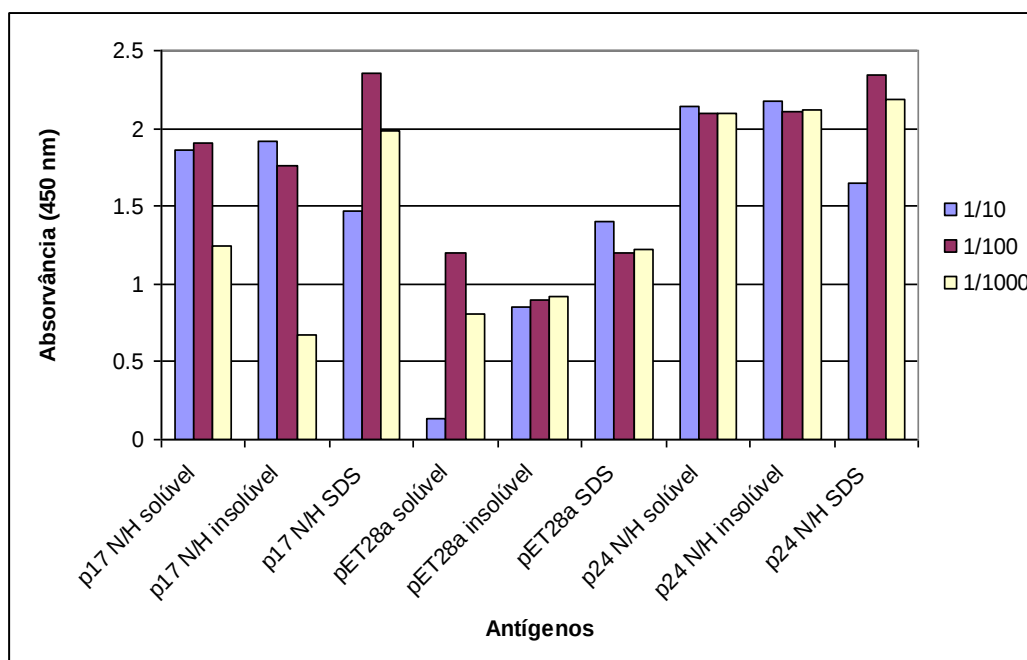


**FIGURA 24:** SDS-PAGE da determinação da solubilidade da proteína FIVp17N'. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®); Coluna 1: controle negativo (pET28a fechado) no momento 0 h; Colunas 2 e 3: cultura pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII induzida nos momentos 0 e 3 h, respectivamente; Coluna 4: cultura pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII não induzida; Colunas 5 e 6: fração solúvel e insolúvel da cultura pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII, respectivamente. A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 18,3 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.

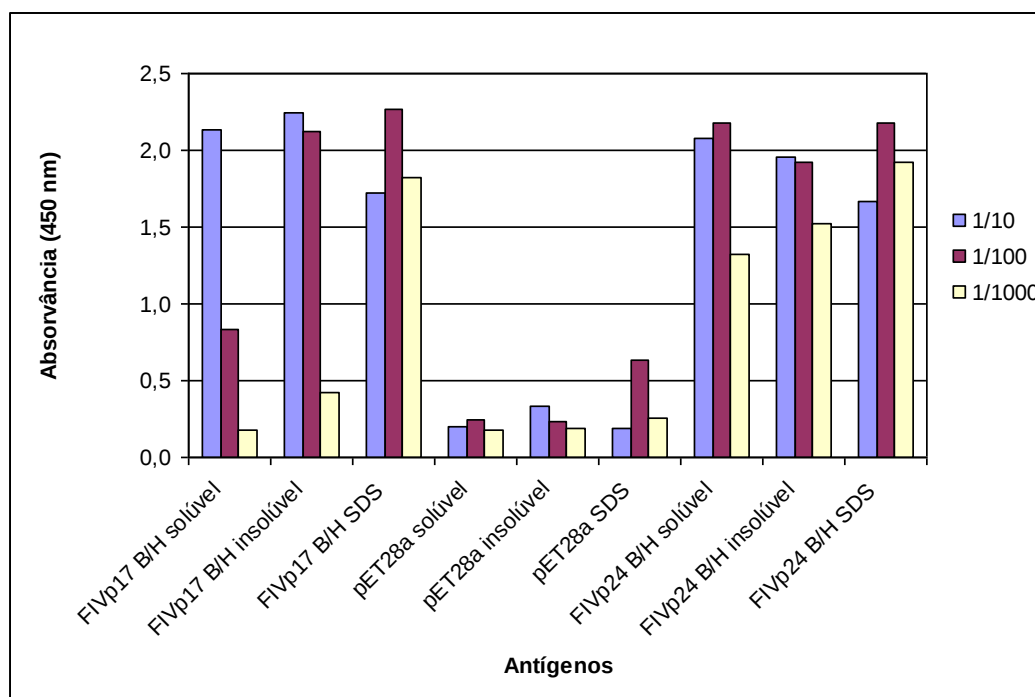
### 5.5.3. Teste de antigenicidade das proteínas recombinantes do FIV

Os resultados do teste de antigenicidade das proteínas recombinantes FIVp24C' e FIVp17C' podem ser observados na figura 25. O controle negativo (pET28a fechado) apresentou reatividade com o soro do gato positivo, possivelmente porque o gato possui anticorpos contra proteínas produzidas por *E. coli*, e não foi realizado o procedimento de bloqueio do soro com as proteínas presentes na cultura pET28a fechado, que já havia mostrado que diminui essa reatividade (TANIWAKI, 2009). Porém, ainda observa-se que a reatividade do soro positivo contra as frações solúvel e insolúvel, assim como o extrato total tratado com SDS da cultura FIVp24 NcoI/HindIII é superior em relação ao controle negativo (pET28a fechado). Apesar de algumas diluições da cultura FIVp17 NcoI/HindIII apresentarem  $A_{450}$  menor ou muito próximo ao controle negativo, é possível notar que a proteína recombinante produzida reage com o soro positivo, e provavelmente depois da purificação essa reação inespecífica será diminuída. Também foi observado que havia presença das duas proteínas recombinantes tanto na porção solúvel quanto na insolúvel em quantidade semelhante.

Os resultados do teste de antigenicidade das proteínas FIVp24N' e FIVp17N' produzidas podem ser observados na figura 26. Tanto a fração solúvel quanto a insolúvel das culturas FIVp24 BamHI/HindIII e FIVp17 BamHI/HindIII reagiram com o soro do gato positivo obtendo  $A_{450}$  próximo de 2,0 enquanto que o controle negativo (pET28a fechado) mostrou  $A_{450}$  abaixo de 0,4. A detecção do antígeno FIVp24N' nas frações solúvel e insolúvel não apresentou diferença mesmo na maior diluição (1/1000). No entanto, observa-se que o antígeno FIVp17N' possui maior concentração na fração insolúvel, pois apresentou reatividade maior ( $A_{450} > 2,0$ ) na diluição 1/100, enquanto que na fração solúvel apresentou  $A_{450} < 1,0$ . Além disso, observou-se que mesmo as culturas FIVp24 BamHI/HindIII e FIVp17 BamHI/HindIII tratadas com SDS mostraram reatividade contra o soro FIV positivo ( $A_{450} > 1,6$ ), em todas as diluições. Pela facilidade de trabalho e por se tratar de uma proteína com conformação mais próxima da nativa, optou-se em utilizar apenas a porção solúvel das culturas FIVp24 BamHI/HindIII, FIVp17 BamHI/HindIII, FIVp24 NcoI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII.



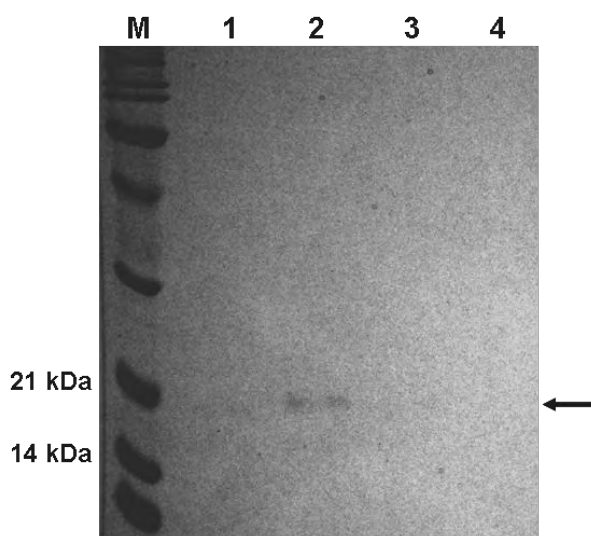
**FIGURA 25:** Resultado do ELISA indireto para teste de antigenicidade das proteínas FIVp24C' e FIVp17C'. Antígenos: fração solúvel e insolúvel, e extrato total tratado com SDS das culturas FIVp17 NcoI/HindIII, pET 28a fechado (controle negativo) e FIVp24 NcoI/HindIII. Cada antígeno foi diluído 1/10, 1/100 e 1/1000.



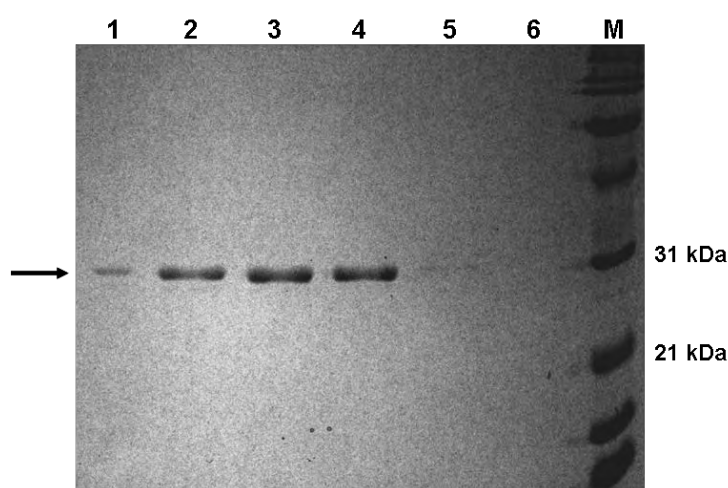
**FIGURA 26:** Resultado do ELISA indireto para teste de antigenicidade das proteínas FIVp24N' e FIVp17N'. Antígenos: fração solúvel e insolúvel, e extrato total tratado com SDS das culturas FIVp17 BamHI/HindIII, pET 28a fechado (controle negativo) e FIVp24 BamHI/HindIII. Cada antígeno foi diluído 1/10, 1/100 e 1/1000.

## 5.6. Purificação das proteínas recombinantes do FIV

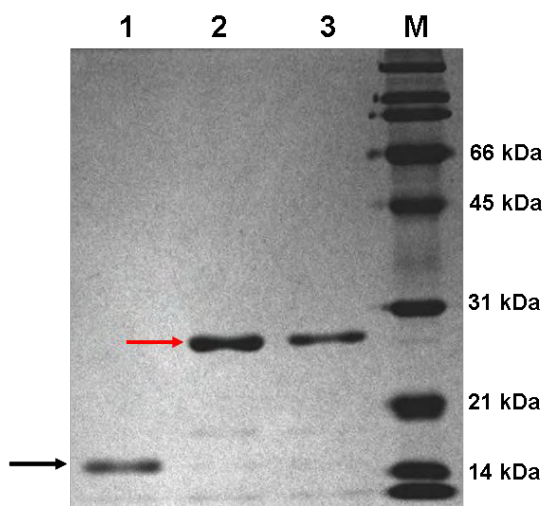
A análise de SDS-PAGE das frações purificadas que apresentaram pico de leitura a 280 nm mostrou presença de bandas de tamanho esperado de aproximadamente 18,3 (Figura 27), 28,3 (Figura 28), 16,4 e 26,4 kDa (Figura 29) referente às proteínas FIVp17N', FIVp24N', FIVp17C' e FIVp24C', respectivamente.



**FIGURA 27:** SDS-PAGE após purificação da proteína FIVp17N'. M: marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®); Coluna 1 a 4: frações 11, 17, 22 e 27 da purificação, respectivamente. A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 18,3 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.



**FIGURA 28:** SDS-PAGE após purificação da proteína FIVp24N'. Coluna 1 a 6: frações 55, 56, 59, 60, 67 e 70 da purificação, respectivamente; M: marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 28,3 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.

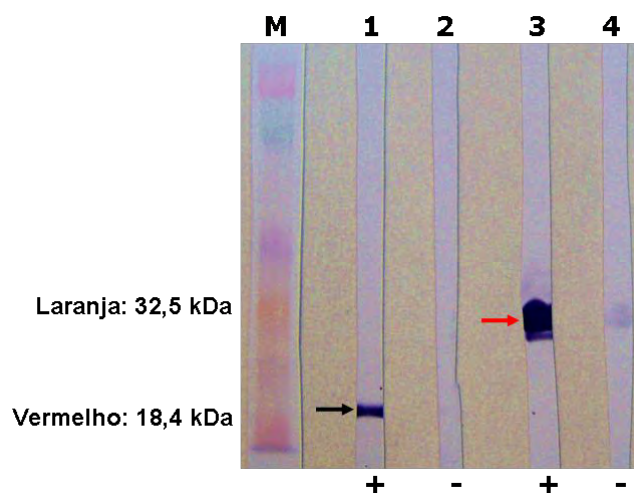


**FIGURA 29:** SDS-PAGE após purificação das proteínas FIVp17C' e FIVp24C'. Coluna 1: fração 12 de purificação da FIVp17C'; Colunas 2 e 3 : frações 43 e 45 da FIVp24C', respectivamente; M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). As setas preta e vermelha indicam banda com tamanho esperado de aproximadamente 16,4 kDa e 26,4 kDa, respectivamente. Gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie blue.

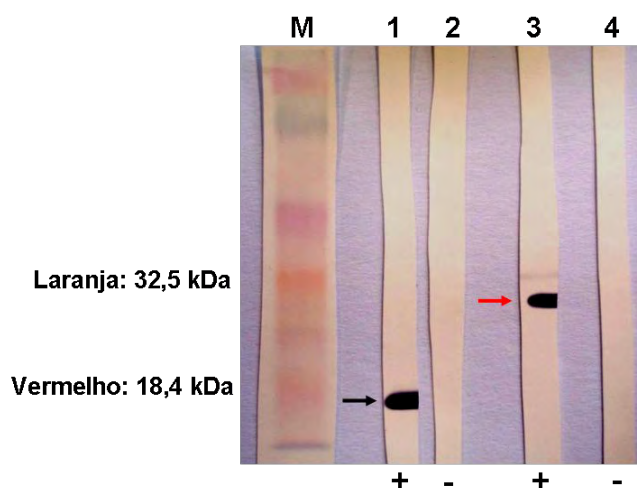
As frações 17 e 18 (FIVp17N'), e 56 a 60 (FIVp24N') foram selecionadas e unidas num mesmo tubo para cada proteína para a quantificação e reações posteriores. A concentração das proteínas FIVp17N' e FIVp24N' foi estimada em 50 µg/mL e 930 µg/mL, respectivamente, pelo método de BCA em comparação com a curva padrão de BSA. Da mesma forma, a concentração estimada das proteínas foi, respectivamente, de 137 e 118,8 µg/mL para as frações 11 e 12 da proteína FIVp17C', e 153,4, 119,7 e 77,9 µg/mL para as frações 43, 44 e 45 da proteína FIVp24C', em comparação com a curva padrão de BSA. Observou-se também que o coquetel de inibidores de proteases foi mais eficiente em prevenir a degradação das proteínas recombinantes em comparação com o uso isolado do PMSF.

### 5.7. Especificidade das proteínas recombinantes do FIV

Nas figuras 30 e 31 observa-se que o soro do gato positivo reagiu especificamente com as proteínas recombinantes FIVp17N', FIVp24N', FIVp17C' e FIVp24C' pela presença de banda única de tamanho esperado. Além disso, nota-se que o soro negativo não apresentou reação contra as proteínas produzidas.



**FIGURA 30:** Western blot para confirmar a especificidade dos antígenos FIVp17N' e FIVp24N'. M: Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-rad®); Tiras 1 e 2: FIVp17N'; Tiras 3 e 4: FIVp24N'; Soros positivo (+) e negativo (-). As setas preta e vermelha indicam banda com tamanho esperado de aproximadamente 18,3 kDa e 28,3 kDa, respectivamente.



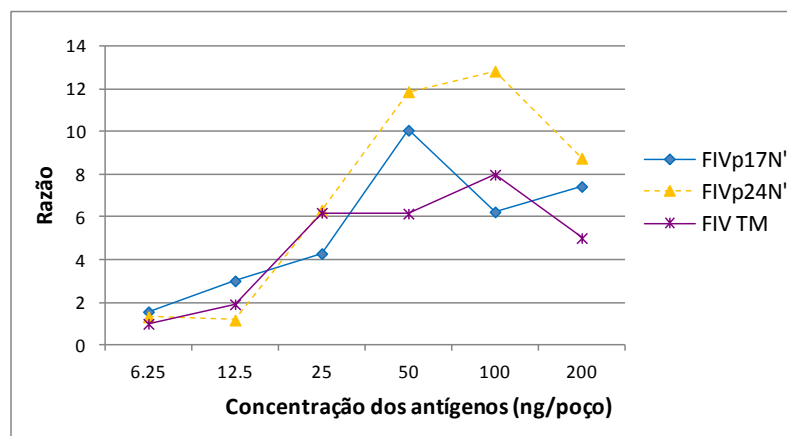
**FIGURA 31:** Western blot para confirmar a especificidade dos antígenos FIVp17C' e FIVp24C'. M: Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-rad®). Tiras 1 e 2: FIVp17C'; Tiras 3 e 4: FIVp24C'. Soros positivo (+) e negativo (-). As setas preta e vermelha indicam banda com tamanho esperado de aproximadamente 16,4 kDa e 26,4 kDa, respectivamente.

## 5.8. ELISA indireto

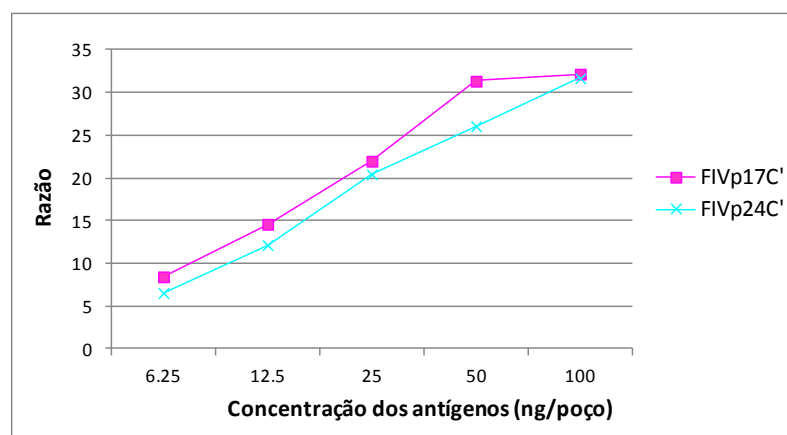
### 5.8.1. Determinação da concentração dos antígenos

Como pode ser observada na figura 32, a concentração de 50 ng/poço do antígeno FIVp17N' e 100 ng/poço do peptídeo TM mostraram ser a ideal para sensibilizar a placa, uma vez que obtiveram a maior razão entre a média

da duplicata da amostra positiva em relação com a média do negativo. Já na figura 33, foi observada que a razão entre as médias das duplicatas da amostra positiva em relação às médias da amostra negativa aumentam com o aumento da concentração dos antígenos FIVp17C' e FIVp24C'. Portanto quanto maior a concentração de antígeno usada, maior a diferença entre a absorvância do positivo e o negativo. No entanto, para economizar os antígenos foi escolhida a concentração de 25 ng/poço das proteínas FIVp17C' e FIVp24C', uma vez que a reação positiva possuía  $A_{450}$  média 20 vezes maior em relação ao negativo. Pelo mesmo motivo, foi considerada adequada a concentração de 50 ng/poço do antígeno FIVp24N', pois a reação positiva possui  $A_{450}$  média 11,8 vezes maior em relação ao negativo.



**FIGURA 32:** Determinação da concentração ideal dos antígenos FIVp17N', FIVp24N' e FIV-TM. Razão entre as médias das duplicatas dos soros positivos em relação às médias das duplicatas dos soros negativos, utilizando as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 ng/poço dos antígenos.



**FIGURA 33:** Determinação da concentração ideal dos antígenos FIVp17C' e FIVp24C'. Razão entre as médias das duplicatas dos soros positivos em relação às médias das duplicatas dos soros negativos, utilizando as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 ng/poço dos antígenos FIVp17C' e FIVp24C'.

## **5.9. Padronização do ELISA indireto rápido**

### **5.9.1. Teste inicial com todos os antígenos**

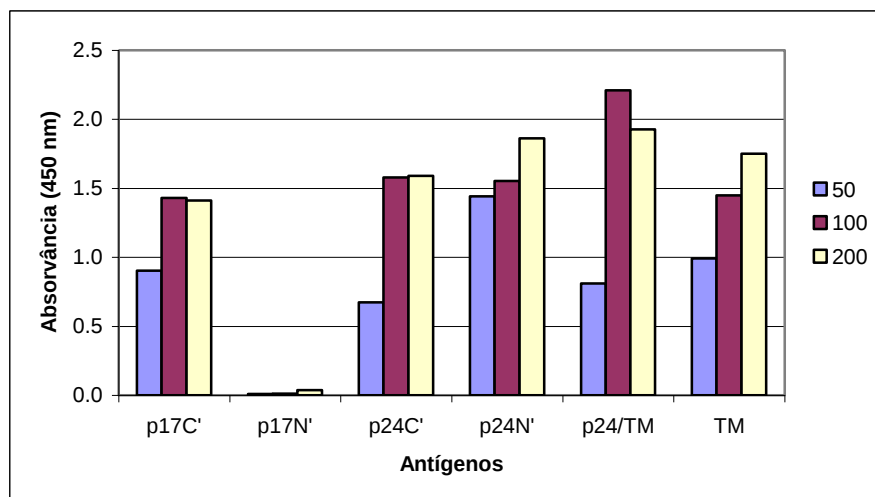
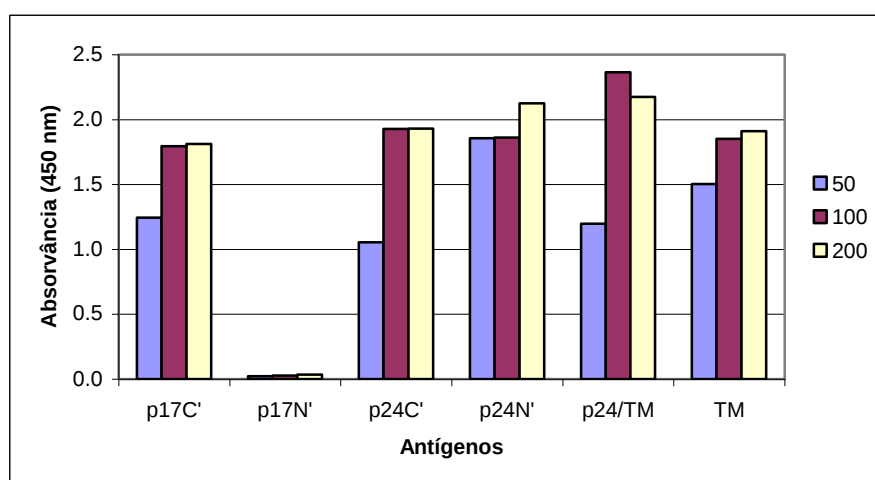
No primeiro teste com incubação de 15 min, os valores de absorvância obtidos com todos os antígenos foram muito baixos ( $<0,5$ ), por isso houve a necessidade da padronização da concentração dos antígenos e diluição do conjugado para a realização do ELISA indireto rápido.

### **5.9.2. Teste de concentração de antígeno e diluição do conjugado**

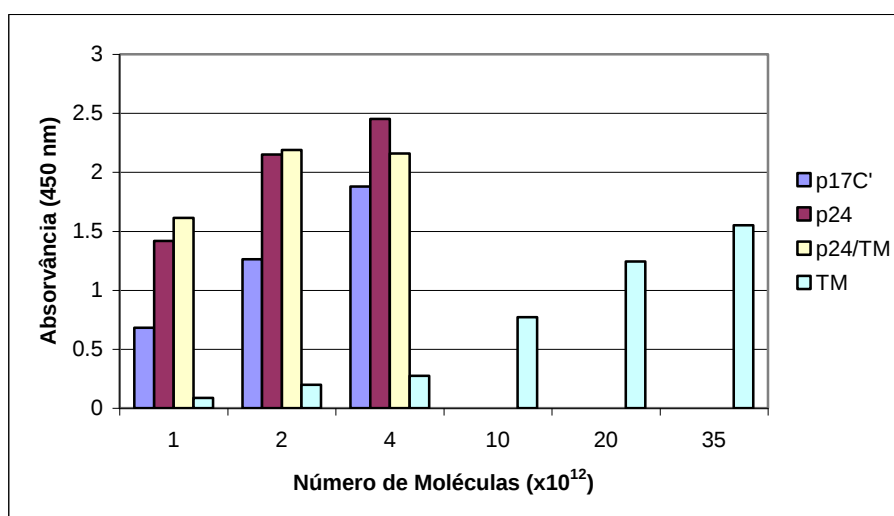
Na figura 34, observa-se que o antígeno FIVp17N' não apresentou reatividade com o soro positivo, por isso não foi mais utilizado nos testes subsequentes. Com exceção do antígeno FIVp17N', todos os antígenos na concentração de 100 ng/poço apresentaram absorvância próximo ou superior a 1,5, com o conjugado diluído 1/1000. Por isso, apesar do conjugado na diluição 1/500 aumentar o sinal da reação em relação ao conjugado diluído 1/1000, para os outros testes foi utilizada a diluição de 1/1000 do conjugado e concentração dos antígenos de 100 ng/poço. Todos os antígenos apresentaram valores de absorvância abaixo de 0,07 com o soro negativo (dados não mostrados).

### **5.9.3. Teste de concentração dos antígenos em número de moléculas**

Todos os antígenos apresentaram um aumento na sua reatividade com o aumento do número de moléculas adsorvidas na placa (Figura 35). Também foi demonstrado que o antígeno FIV-TM necessita de maior quantidade de moléculas a ser adsorvida na placa para obter uma  $A_{450}$  de 1,5. Foi decidido então utilizar a concentração de  $2 \times 10^{12}$  moléculas/poço para os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM. Todos os antígenos apresentaram valores de absorvância abaixo de 0,09 com o soro negativo (dados não mostrados).

**A****B**

**FIGURA 34:** Resultado do ELISA indireto rápido com conjugado diluído 1/1000 (A) e 1/500 (B). A concentração de cada antígeno foi de 50, 100 e 200 ng/poço.



**FIGURA 35:** Resultado do ELISA indireto rápido com a concentração de antígenos em número de moléculas por poço.

### 5.10. ELISA indireto rápido

Após a padronização do ELISA indireto rápido, o tempo de realização do teste diminuiu bastante em relação ao protocolo convencional, como pode ser observado na tabela 4.

**TABELA 4:** Comparação dos protocolos de ELISA indireto convencional e rápido.

| <b>Etapas</b>          | <b>ELISA indireto convencional</b> | <b>ELISA indireto rápido</b> |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Adsorção do antígeno   | 16 h                               | 16 h                         |
| Bloqueio da placa      | 1 h                                | 1 h                          |
| Incubação dos soros    | 1 h                                | 15 min                       |
| Incubação do conjugado | 1 h                                | 15 min                       |
| Substrato+cromógeno    | 15 min                             | 15 min                       |
| Bloqueador enzimático  | -                                  | -                            |

#### 5.10.1. Processamento das amostras

A comparação entre os resultados do ELISA indireto rápido realizado com os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM em relação aos resultados do SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test estão apresentados no anexo 1. Pode-se observar os valores de sensibilidade e especificidade relativa e a concordância entre os métodos diagnósticos (teste *kappa*), utilizando como pontos de corte a média das 63 amostras negativas mais 3 a 7 desvios padrão. Os resultados com o melhor ponto de corte para cada antígeno encontram-se descritos nas tabelas 5 e 6, e os valores de ponto de corte e  $A_{450}$  das amostras consideradas positivas estão apresentados na tabela 7. Todos os antígenos apresentaram ótima concordância com o SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test, sendo a concordância máxima ( $k=1$ ) observada com o antígeno FIVp24/TM.

**TABELA 5:** Comparação entre os resultados do SNAP® FIV/FelV Combo test e o ELISA indireto com os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM, com valores em absorvância.

| Antígenos           |          | SNAP® FIV/FelV Combo |           | Total | Teste<br><i>kappa</i> |
|---------------------|----------|----------------------|-----------|-------|-----------------------|
|                     |          | Positivo             | Negativo  |       |                       |
| p17C'<br>4 desvios  | Positivo | 46                   | 0         | 46    | <i>k</i> =0,98        |
|                     | Negativo | 1                    | 63        | 64    |                       |
|                     | Total    | 47                   | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=97,87%            | Sp=100%   |       |                       |
| p24C'<br>5 desvios  | Positivo | 46                   | 0         | 46    | <i>k</i> =0,98        |
|                     | Negativo | 1                    | 63        | 64    |                       |
|                     | Total    | 47                   | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=97,87%            | Sp=100%   |       |                       |
| TM<br>3 desvios     | Positivo | 40                   | 1         | 41    | <i>k</i> =0,94        |
|                     | Negativo | 7                    | 62        | 69    |                       |
|                     | Total    | 47                   | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=85,11%            | Sp=98,41% |       |                       |
| p24/TM<br>6 desvios | Positivo | 47                   | 0         | 47    | <i>k</i> =1,0         |
|                     | Negativo | 0                    | 63        | 63    |                       |
|                     | Total    | 47                   | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=100%              | Sp=100%   |       |                       |

Se: sensibilidade; Sp: especificidade.

**TABELA 6:** Comparação entre os resultados do SNAP® FIV/FelV Combo test e o ELISA indireto com os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM, com valores em índice ELISA.

| Antígenos           |          | SNAP® FIV/FelV<br>Combo |           | Total | Teste<br><i>kappa</i> |
|---------------------|----------|-------------------------|-----------|-------|-----------------------|
|                     |          | Positivo                | Negativo  |       |                       |
| p17C'<br>3 desvios  | Positivo | 45                      | 2         | 47    | <i>k</i> =0,93        |
|                     | Negativo | 2                       | 61        | 63    |                       |
|                     | Total    | 47                      | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=95,74%               | Sp=96,83% |       |                       |
| p24<br>5 desvios    | Positivo | 46                      | 0         | 46    | <i>k</i> =0,98        |
|                     | Negativo | 1                       | 63        | 64    |                       |
|                     | Total    | 47                      | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=97,87%               | Sp=100%   |       |                       |
| TM<br>3 desvios     | Positivo | 33                      | 1         | 34    | <i>k</i> =0,71        |
|                     | Negativo | 14                      | 62        | 76    |                       |
|                     | Total    | 47                      | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=70,21%               | Sp=98,41% |       |                       |
| p24/TM<br>5 desvios | Positivo | 47                      | 0         | 47    | <i>k</i> =1,0         |
|                     | Negativo | 0                       | 63        | 63    |                       |
|                     | Total    | 47                      | 63        | 110   |                       |
|                     |          | Se=100%                 | Sp=100%   |       |                       |

Se: sensibilidade; Sp: especificidade.

**TABELA 7:** Valores de ponto de corte utilizados para reação com cada antígeno recombinante e valores em absorvância das amostras positivas.

| Antígeno  | Desvios | Ponto de corte | A <sub>450</sub> mín. | A <sub>450</sub> máx. | A <sub>450</sub> méd. |
|-----------|---------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| FIVp17C'  | 4       | 0,126          | 0,140                 | 2,313                 | 0,733                 |
| FIVp24C'  | 5       | 0,141          | 0,238                 | 2,725                 | 1,571                 |
| FIV-TM    | 3       | 0,072          | 0,081                 | 1,521                 | 0,367                 |
| FIVp24/TM | 6       | 0,485          | 0,729                 | 2,663                 | 1,847                 |

A<sub>450</sub> mín.:absorvância mínima

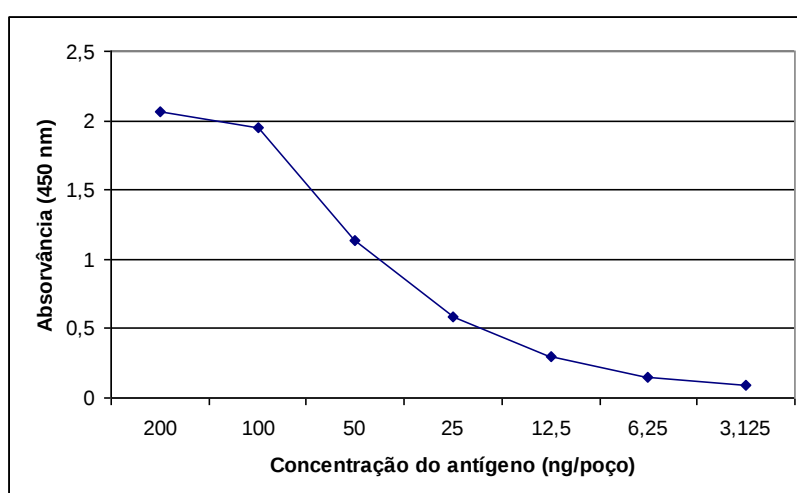
A<sub>450</sub> máx.:absorvância máxima

A<sub>450</sub> méd.:absorvância média

## 5.11. ELISA indireto rápido para uso comercial

### 5.11.1. Titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato

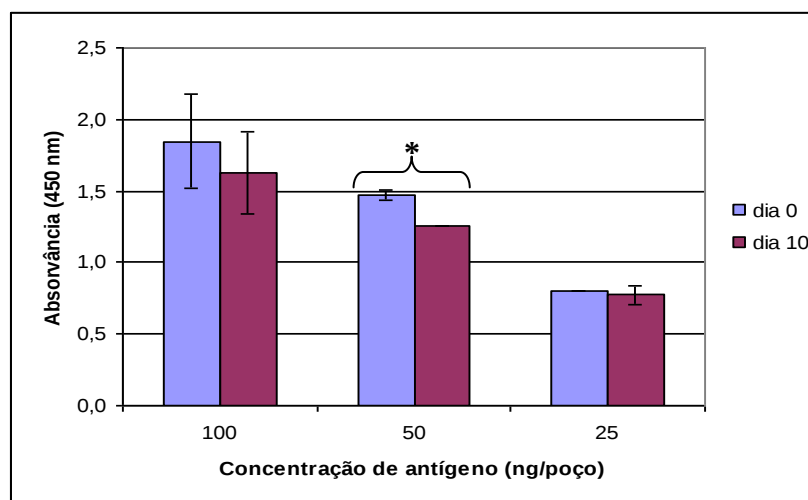
Os resultados da titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato estão demonstrados na figura 36. Observa-se diminuição gradual da reatividade com a diminuição da quantidade de IgG adsorvida na placa. A concentração de 100 ng de IgG mostrou ser a ideal para os próximos testes.



**FIGURA 36:** Titulação da IgG de coelho anti-IgG de gato, utilizando as concentrações de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200ng/poço.

### 5.11.2. Armazenamento das microtiras de ELISA

Durante a padronização da melhor maneira de realizar o armazenamento das tiras de ELISA, foi observado que as lavagens com o PBST com 0,1% de azida sódica em todas as etapas provavelmente causou interferência na reação, pois houve uma diminuição drástica no sinal. Além disso, foi notado que tanto a azida sódica 0,1% quanto o timerosal 0,01% não traziam benefícios para a conservação quando usados apenas após o bloqueio, uma vez que as tiras sem conservante possuíam a mesma absorvância média. Além disso, observou-se que a secagem na geladeira (4-8°C) durante aproximadamente 18 h não prejudicava a reatividade do teste, o que ocorria após secagem a 37 °C por 1 h. Portanto, o próximo passo, foi realizar um teste de conservação de 10 dias em geladeira, sem o uso de conservantes e com secagem na geladeira. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 37, onde nota-se que houve uma pequena diminuição da  $A_{450}$  após secagem e armazenamento em geladeira em relação ao teste realizado sem o armazenamento. No entanto essa diferença só foi significativa ( $p>0,05$ ) quando utilizado a concentração de 50 ng/poço. Por isso, foi decidido prosseguir o teste de tempo de manutenção da reatividade dos antígenos com as condições já descritas, principalmente pelo pouco tempo que nos restava para avaliar quantos meses as tiras poderiam ser mantidas em geladeira sem alteração da sensibilidade do teste.

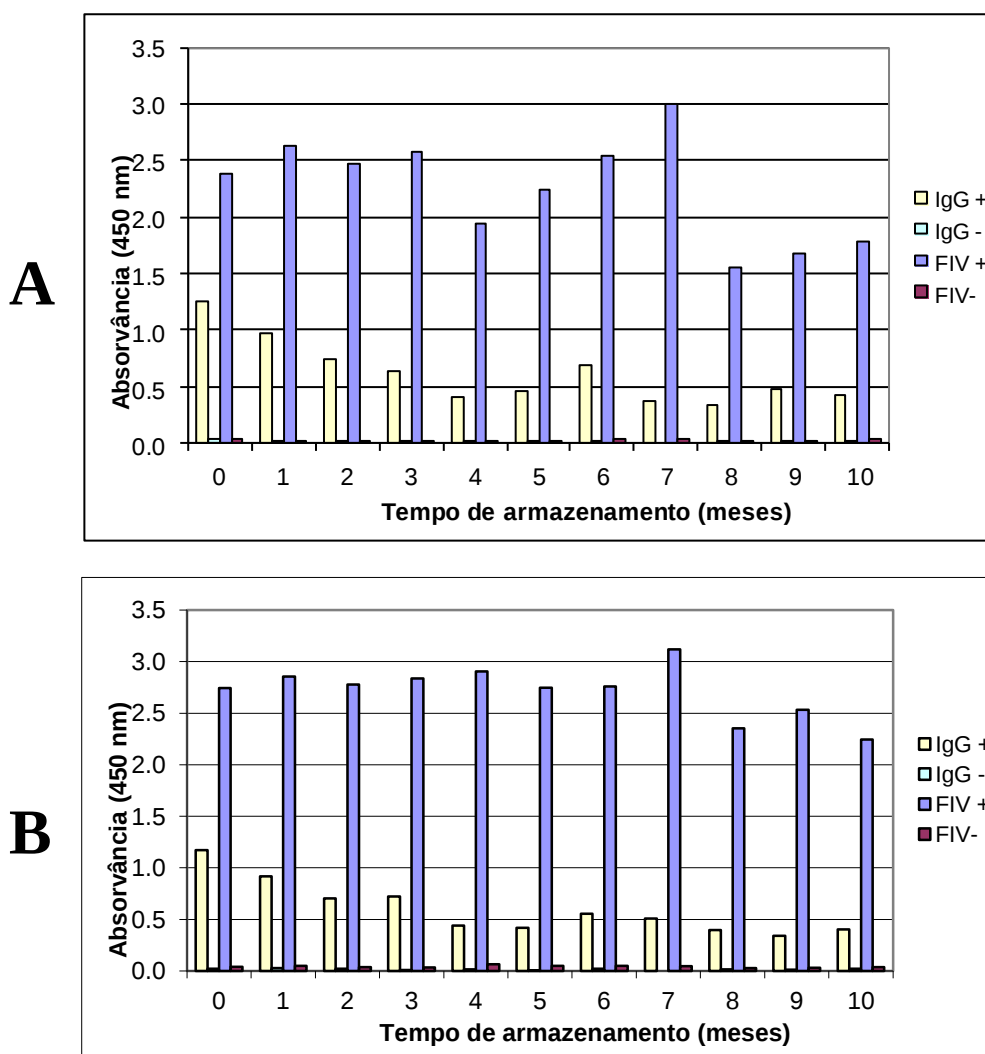


**FIGURA 37:** Armazenamento das tiras de ELISA com IgG anti-IgG de gato sem conservantes. A reação foi realizada sem (dia 0) e após 10 dias (dia 10) de armazenamento em geladeira. \*Diferença significativa ( $p>0,05$ ).

## 5.12. Validação do ELISA indireto rápido com antígeno FIVp24/TM

### 5.12.1. Tempo de manutenção da reatividade dos antígenos

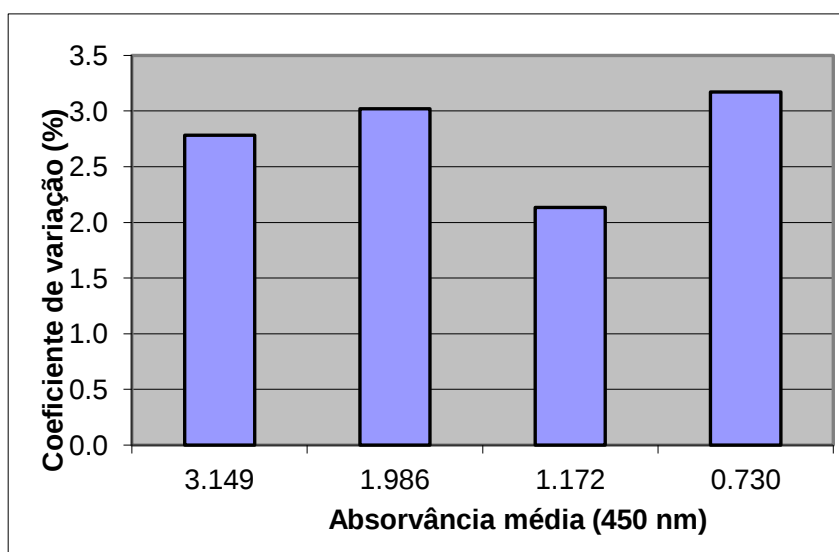
O antígeno FIVp24/TM manteve a sua reatividade após o armazenamento em geladeira até o último momento analisado durante o período de 10 meses, com maior estabilidade do antígeno nas tiras de ELISA bloqueadas com 10% LPD em TCB com adição de inibidores de protease (Figura 38). Também foi observado que a IgG de coelho anti IgG de gato, que foi colocada no teste para agir como controle positivo de reação, sofreu diminuição na sua reatividade ao longo do teste (Figura 38).



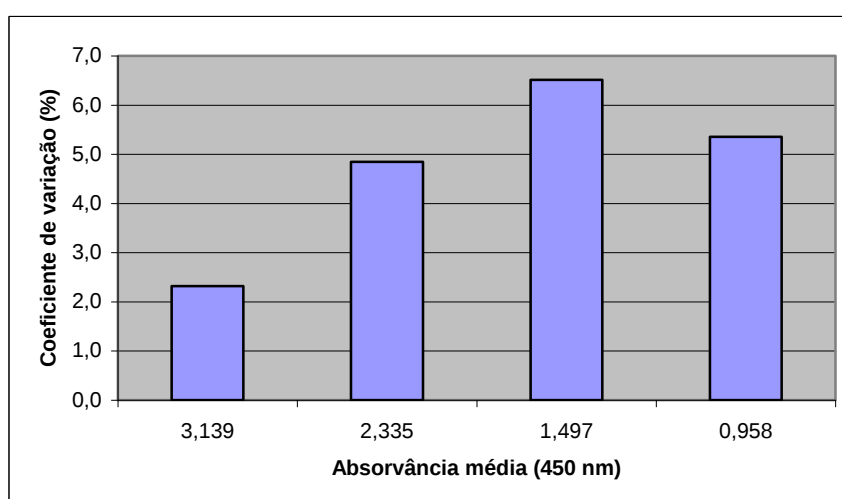
**FIGURA 38:** Tempo de manutenção da reatividade dos antígenos FIVp24/TM e Anti-IgG gato sem (A) e com (B) o uso de inibidor de protease no bloqueio. Na reação com o antígeno Anti-IgG de gato: soro de gato (+) e soro de cão (-). Na reação com antígeno FIVp24/TM: “pool” de soros FIV positivos (FIV+) e soros FIV negativos (FIV-).

### 5.12.2. Determinação da repetibilidade do ELISA indireto com antígeno FIVp24/TM

O coeficiente de variação intra-teste mostrou valores entre 2,13 e 3,17% (Figura 39), ao passo que o inter-teste obteve valores entre 2,32 e 6,51 (Figura 40). Esses valores mostram uma baixa variação tanto dentro de uma mesma corrida quanto entre corridas diferentes, utilizando amostras que abrangem concentrações alta, média e baixa de anticorpos, com  $A_{450}$  de 3,0 a 0,7.



**FIGURA 39:** Coeficiente de variação intra-teste. Foram utilizados o soro puro ( $A_{450}=3,149$ ) e as diluições 1/5 ( $A_{450}=1,986$ ), 1/10 ( $A_{450}=1,172$ ) e 1/15 ( $A_{450}=0,730$ ).



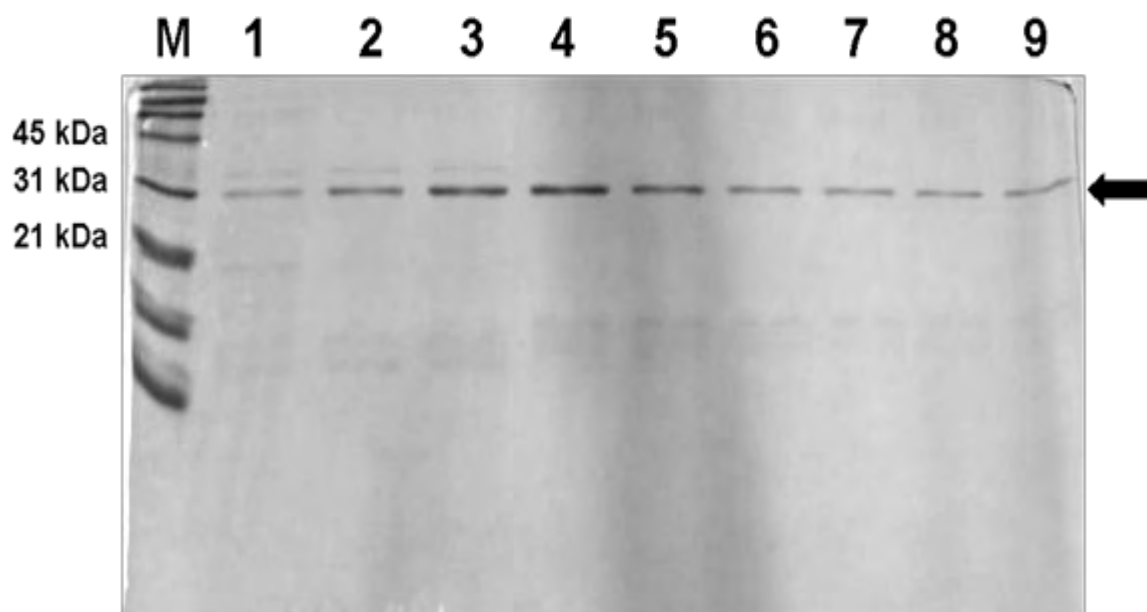
**FIGURA 40:** Coeficiente de variação inter-teste. Foram utilizados o soro puro ( $A_{450}=3,139$ ) e as diluições 1/5 ( $A_{450}=2,335$ ), 1/10 ( $A_{450}=1,497$ ) e 1/15 ( $A_{450}=0,958$ ).

### **5.13. Padronização do Western blot com proteínas recombinantes do FIV**

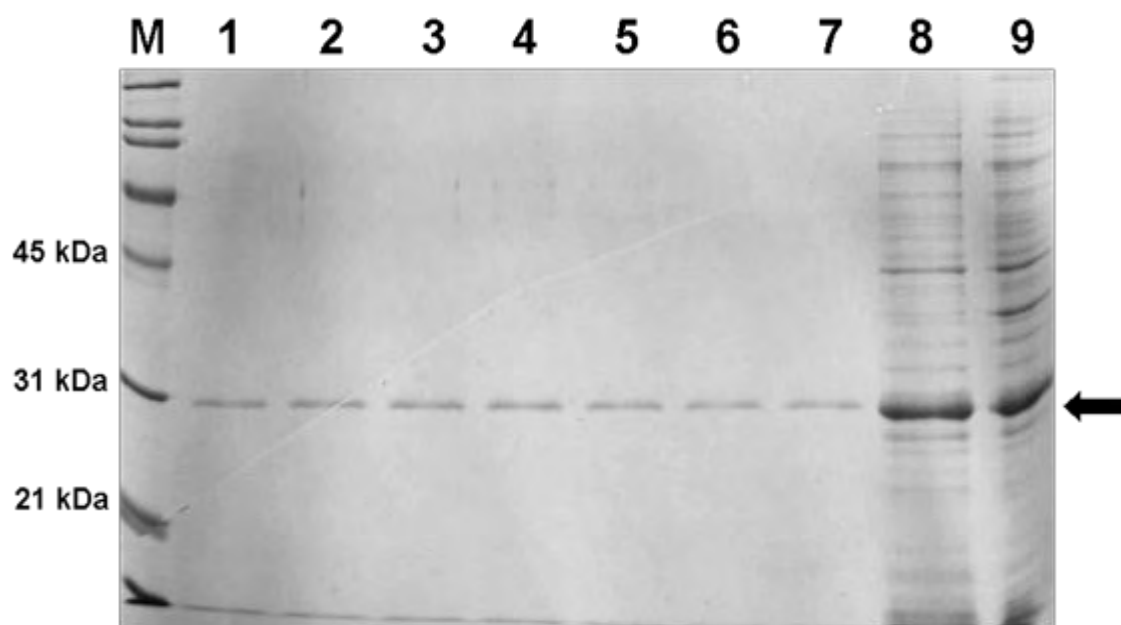
O desenvolvimento da técnica de Western blot com as proteínas recombinantes do FIV que foram produzidas durante o projeto, possibilitou a confirmação da especificidade da técnica de ELISA com os diferentes antígenos.

#### **5.13.1. Produção e purificação da proteína FIVp24/TM**

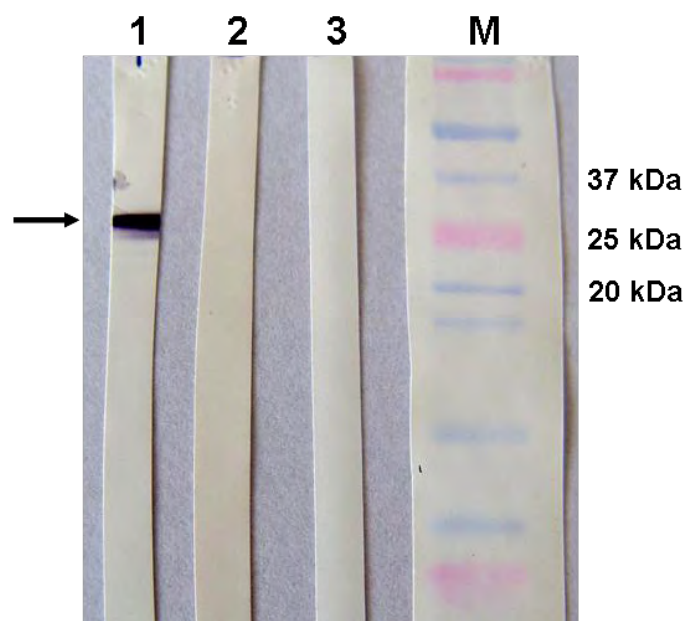
Diferentemente do que ocorreu nas purificações das outras proteínas recombinantes, não houve um pico de saída da proteína recombinante, ou seja, desde a fração 9 até a fração 31 foi observada a presença da proteína FIVp24/TM, com tamanho esperado de aproximadamente 29,8 kDa (Figura 41 e 42). Na figura 41, observou-se presença de bandas inespecíficas fracas de tamanho superior a 31 kDa nas frações 9, 11 e 13, e menores que 21 kDa nas frações 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 23. Porém a presença dessas proteínas inespecíficas não prejudica na especificidade da reação, pois não são reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro dos gatos (Figura 43). A proteína FIVp24/TM foi visualizada em grande quantidade tanto no extrato total da cultura (antes da separação em fração solúvel e insolúvel) como na fração insolúvel, o que demonstra a eficiência na produção da proteína recombinante (Figura 42). Também observou-se que as frações com maior concentração de proteína FIVp24/TM estavam entre a fração 13 a 17 (colunas 3 a 5 na Figura 41). A concentração da fração 15 da proteína FIVp24/TM purificada, estimada pelo método de BCA em comparação à curva padrão de concentração de BSA, foi de 107,4 µg/mL. Essa fração foi utilizada para a reação posterior de Western blot, pois tinha uma concentração maior em relação às outras frações pelo gel de SDS-PAGE e não apresentava sinais de degradação da proteína, o que prejudicaria a interpretação dos resultados.



**FIGURA 41:** SDS-PAGE das frações 9 a 24 após purificação da proteína FIVp24/TM. Colunas 1 a 9: frações 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 e 24, respectivamente. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 29,8 kDa. Gel de separação de 20% e coloração com Coomassie blue.



**FIGURA 42:** SDS-PAGE das frações 25 a 31 após purificação da proteína FIVp24/TM (2). Colunas 1 a 7: frações 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31, respectivamente. Coluna 8: fração insolúvel antes da purificação. Coluna 9: extrato total da cultura. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 29,8 kDa. Gel de separação de 12,5% e coloração de Coomassie blue.

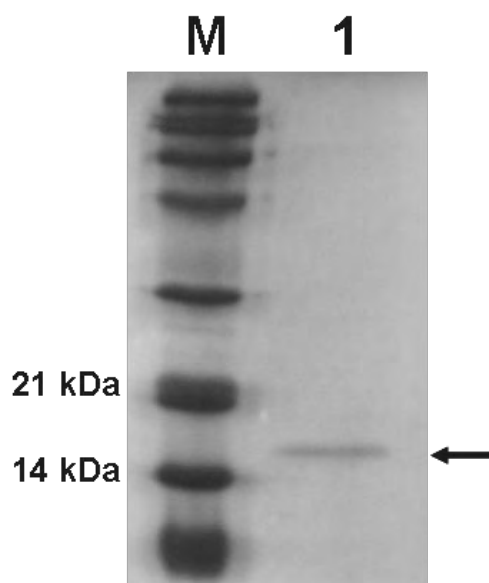


**FIGURA 43:** Western blot para confirmar a especificidade do antígeno FIVp24/TM. Tiras 1 a 3: soros de gatos FIV positivo, FIV/FelV negativo e FelV positivo, respectivamente; M: Marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®). A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 29,8 kDa.

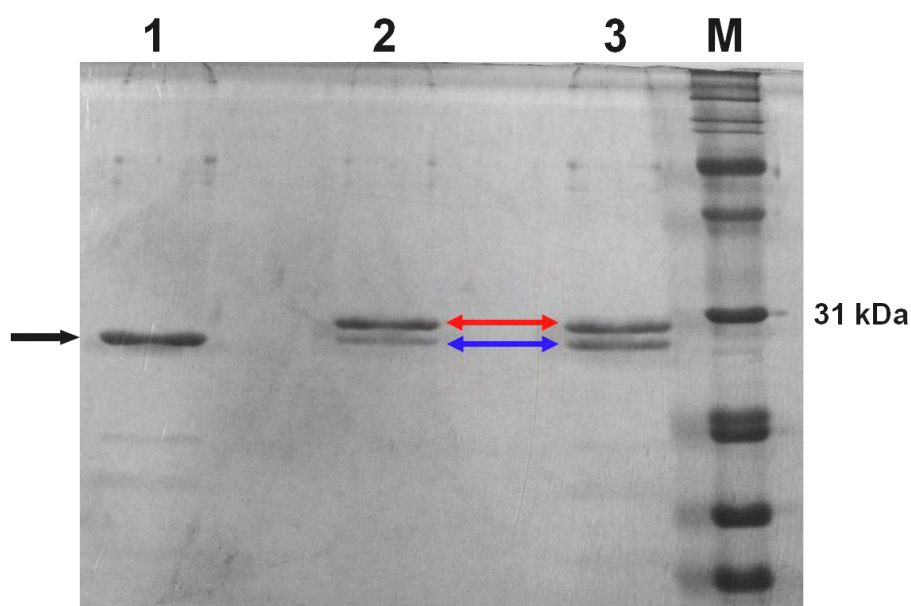
### 5.13.2. SDS-PAGE com Tris-Glicina

Os géis de separação de 12,5%, 15%, 20% e gradiente de 15 a 18%, preparados conforme protocolo de Laemmli (1970), foram úteis para a seleção de proteínas viáveis para o desenvolvimento do Western blot. As proteínas FIVp17C' e FIVp24C' não apresentaram sinais de degradação, no entanto a proteína FIVp24N' apresentou (Figuras 44 e 45). Na figura 45, também observa-se a diferença de tamanho das proteínas FIVp24C' (26,4 kDa) e FIVp24N' (28,3 kDa), que era esperado, pois durante a clonagem com a cauda de histidina na porção C' terminal retirou-se uma porção da região N' termina do plasmídeo, incluindo a cauda de histidina.

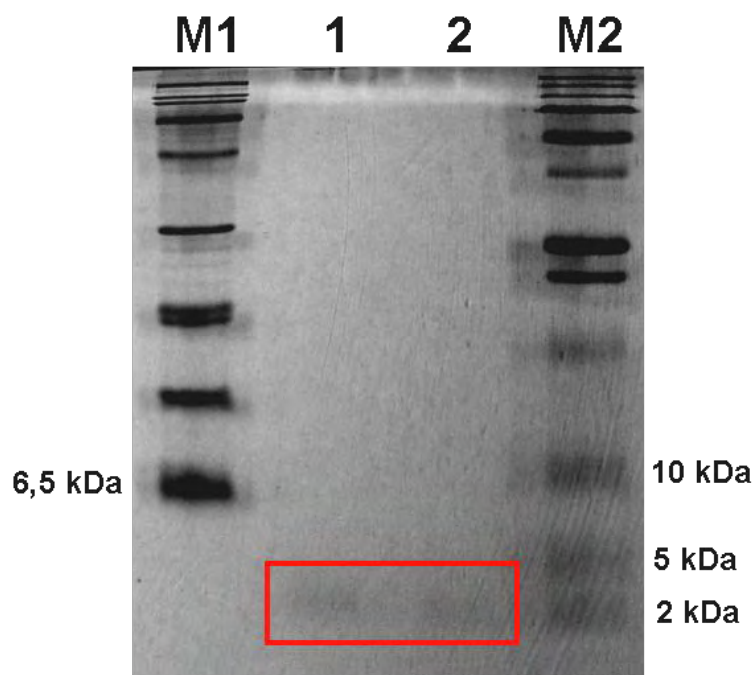
O peptídeo FIV-TM foi observado no gel de separação de 20% nas concentrações de 2 e 4 µg/poço, pela coloração de Commassie blue (Figura 46). No entanto, a banda era visualizada como um borrão próximo ao tamanho de 2 kDa, por isso tentou-se o protocolo de Tris-Tricina para tentar melhorar a resolução do peptídeo. Mesmo sem resolução, todas as duplicatas dos géis foram submetidas ao procedimento de transferência para a membrana de nitrocelulose.



**FIGURA 44:** SDS-PAGE com Tris-Glicina da proteína FIVp17C'. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). Coluna 1: proteína FIVp17C'. A seta indica a presença de banda com tamanho esperado de aproximadamente 16,4 kDa. Gel de separação com gradiente de 15 a 18% e coloração de Coomassie blue.



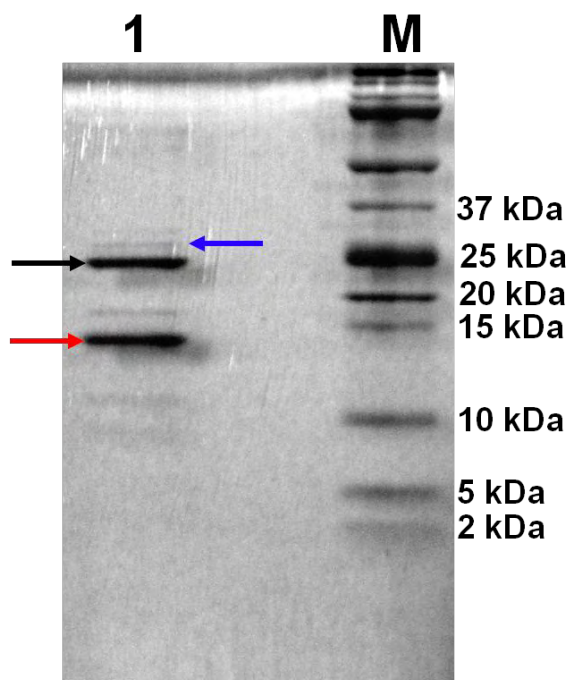
**FIGURA 45:** SDS-PAGE com Tris-Glicina das proteínas FIVp24C' e FIVp24N'. Coluna 1: proteína FIVp24C'. Coluna 2 e 3: proteína FIVp24N' produzida nos dias 17/09/2010 e 09/08/2010, respectivamente. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). A seta preta e vermelha indicam a presença de bandas com tamanhos esperados de aproximadamente 26,4 kDa (FIVp24C') e 28,3 kDa (FIVp24N'), respectivamente. A seta azul indica degradação da proteína FIVp24N'. Gel de separação de 15% e coloração de Coomassie blue.



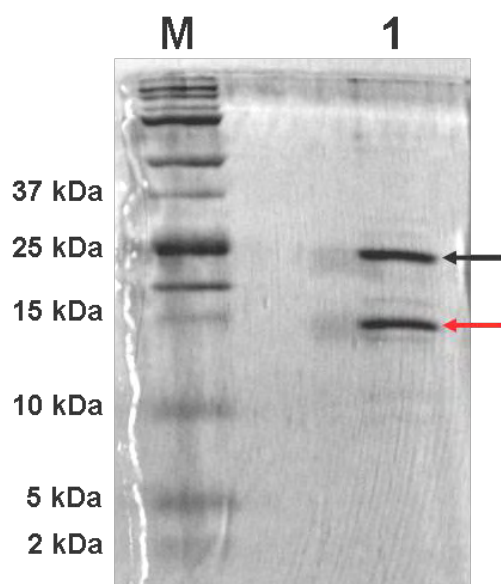
**FIGURA 46:** SDS-PAGE com Tris-Glicina do peptídeo FIV-TM. Colunas 1 e 2: peptídeo FIV-TM nas concentrações de 4 e 2  $\mu\text{g/poço}$ , respectivamente. M1: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). M2: Marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®). O retângulo vermelho delimita presença do peptídeo FIV-TM. Gel de separação de 20% e coloração de Coomassie blue.

### 5.13.3. SDS-PAGE com Tris-Tricina

Os géis de SDS-PAGE com Tris-Tricina com gel de separação de 16% com e sem ureia podem ser observados nas figuras 47 e 48, respectivamente, onde são visualizadas bandas de intensidade forte com tamanho esperado das proteínas FIVp24C' e FIVp17C', porém são visualizadas outras bandas fracas, sendo que uma poderia ser da proteína FIVp24/TM. Além disso, em nenhum dos géis foi possível observar a presença do peptídeo FIV-TM, por isso no próximo passo foi decidido aplicar maior quantidade tanto da proteína FIVp24/TM quanto do peptídeo FIV-TM.



**FIGURA 47:** SDS-PAGE com Tris-Tricina (16%) das proteínas FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM. Coluna 1: proteínas FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM (não visualizada). M: Marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®). As setas azul, preta, vermelha indicam possíveis localizações das proteínas FIVp24/TM (~29,8 kDa), FIVp24C' (~26,4 kDa) e FIVp17C' (~16,4 kDa), respectivamente. Gel de separação de 16% e coloração de Coomassie blue.



**FIGURA 48:** SDS-PAGE com Tris-Tricina (16% com ureia) das proteínas FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM. Coluna 1: proteínas FIVp24/TM (não visualizada), FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM (não visualizada). M: Marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®). As setas preta e vermelha indicam possíveis localizações das proteínas FIVp24C' (~26,4 kDa) e FIVp17C' (~16,4 kDa), respectivamente. Gel de separação de 16% com ureia e coloração de Coomassie blue.

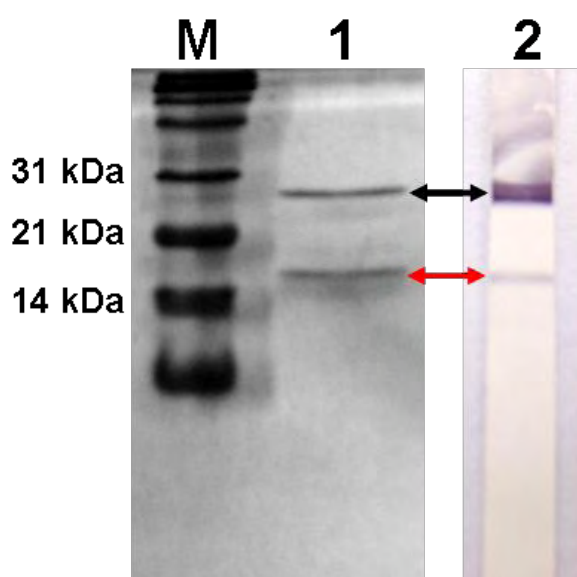
#### 5.13.4. Transferência para a membrana de nitrocelulose

Durante a padronização da transferência das proteínas recombinantes do FIV, foi decidido utilizar a membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,1  $\mu\text{m}$  (Protran – Whatman), na tentativa de conseguir realizar a transferência do peptídeo FIV-TM. Porém, apesar das inúmeras tentativas e a visualização de banda na SDS-PAGE em concentrações altas do peptídeo (Figura 46), não foi possível a visualização de reação contra o peptídeo FIV-TM no Western blot (Figuras 49, 50, 51 e 52). A transferência com o uso de metanol não apresentou benefícios, uma vez que o marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®) ficou um pouco menos nítido e não foi possível a visualização de reação com o peptídeo TM.

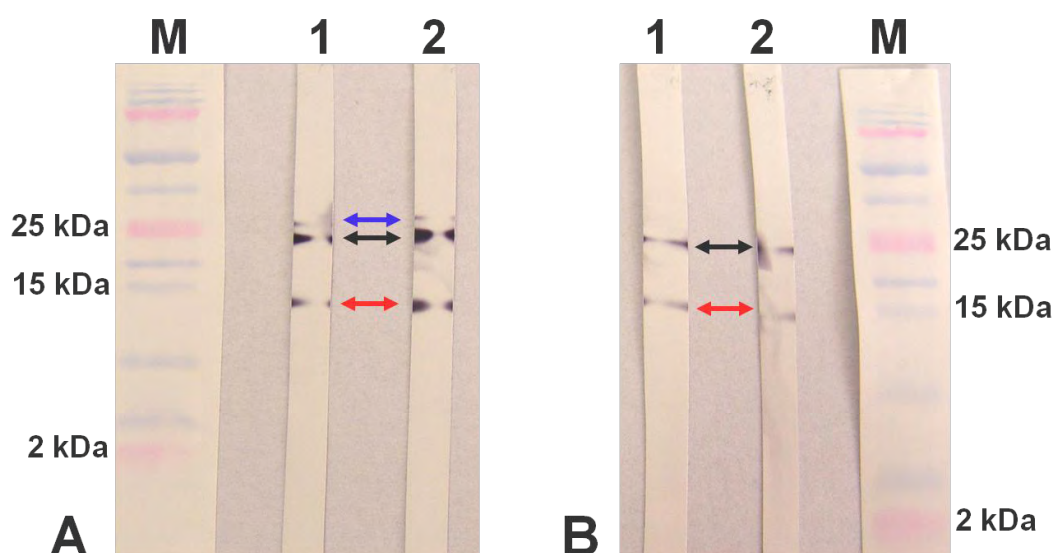
Não houve diferença na intensidade da banda ao usar a diluição 1/50 ou 1/100 da amostra, portanto decidiu-se utilizar a diluição de 1/100 nas demais reações. Na figura 49, observou-se que apesar do peptídeo FIV-TM não ser visualizado, as proteínas FIVp24C' e FIVp17C', com tamanho esperado de aproximadamente 26,4 e 16,4 kDa, respectivamente, eram transferidas com sucesso pela presença de reação com o soro positivo. Além disso, notou-se que apesar das duas proteínas possuírem uma concentração semelhante, estimada por bandas com intensidade iguais no gel de SDS-PAGE, a reação da amostra 2 (Tabela 8) com o antígeno FIVp24C' foi maior em relação com o antígeno FIVp17C' (Figura 49). Isso mostrou a possibilidade de confirmar que a quantidade de anticorpos circulantes contra o antígeno recombinante presente em um gato, explicaria, por exemplo, a baixa reatividade do ELISA indireto com o antígeno FIVp17.

Como uma alternativa para a detecção do peptídeo FIV-TM, foi decidido utilizar o antígeno FIVp24/TM, que possui tanto o antígeno FIVp24 quanto o peptídeo TM. Na figura 50, pode ser observado a presença de reação contra as proteínas FIVp24/TM, FIVp24C' e FIVp17C', com bandas de tamanho esperado. Contudo, a reação contra o antígeno FIVp24/TM foi menor (Figura 50), o que já era esperado, uma vez que na coloração de Coomassie blue (Figura 47) a proteína apresentava banda fraca. Assim, foi decidido aumentar a concentração da proteína FIVp24/TM, deixando todas as proteínas com concentrações parecidas, para possibilitar a avaliação da reatividade do soro

contra cada antígeno. Também foi observado que o gel de Tris-Tricina a 16% sem 6 M de ureia apresentou maior eficiência de transferência das proteínas recombinantes, em relação ao gel de 16% com ureia (Figura 50).



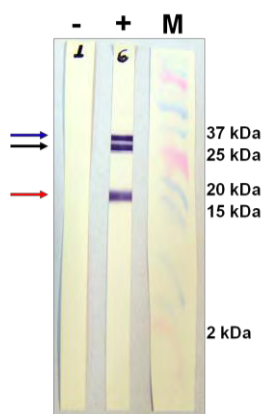
**FIGURA 49:** SDS-PAGE e Western blot com os antígenos FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM. Coluna 1: proteínas FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM (não visualizado) corado com Coomassie blue. Coluna 2: reação do soro FIV positivo no Western blot. M: Marcador SDS-PAGE Standards/Broad range (Bio-Rad®). As setas preta e vermelha indicam os antígenos (coluna 1) ou a reação contra os antígenos (coluna 2) FIVp24C' (~26,4 kDa) e FIVp17C' (~16,4 kDa), respectivamente. SDS-PAGE com Tris-Glicina e gel de separação de 20%.



**FIGURA 50:** Western blot com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM (não visualizado) à partir do gel de Tris-Tricina a 16% sem ureia (A) e com ureia (B). Tiras 1 e 2: soros de gatos FIV positivos. M: Marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®). As setas azul, preta e vermelha indicam reação contra os antígenos FIVp24/TM (~29,8 kDa), FIVp24C' (~26,45 kDa) e FIVp17C' (~16,4 kDa), respectivamente.

#### 5.14. Western blot das amostras

As proteínas FIVp24/TM, FIVp24C' e FIVp17C' foram transferidas com sucesso para a membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,1  $\mu$ m, uma vez que o soro FIV positivo reagiu fortemente com as três proteínas recombinantes (Figura 51). Na figura 51, foram visualizadas 3 bandas de tamanhos distintos, que permite a determinação da presença de anticorpos contra cada antígeno, tendo como base o tamanho de cada proteína. Além disso, a especificidade da reação de Western blot com as proteínas recombinantes produzidas foi confirmada pela ausência de reação com amostras negativas (Figura 51 e 52). Infelizmente, a reação com o peptídeo TM não foi visualizada (Figura 51), no entanto, a reação com o antígeno FIVp24/TM, por possuir tanto o antígeno FIVp24 quanto o epítipo TM, possibilitou a confirmação da presença de anticorpos contra o peptídeo TM (Figura 52). Na tabela 8, estão listadas as 18 amostras submetidas ao teste de Western blot e seus resultados no teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test (IDEXX laboratories) e no ELISA indireto com os antígenos recombinantes. Pode-se observar que foram selecionadas 6 amostras negativas para a infecção pelo FIV, dentre as quais 3 são positivas para a infecção pelo FeLV, e 12 amostras FIV positivas, sendo que em 2 amostras há a coinfeção pelo FeLV (Tabela 8). Todas as amostras positivas para a infecção pelo FIV (SNAP<sup>®</sup> e ELISA indireto rápido) apresentaram reação positiva específica no Western blot.



**FIGURA 51:** Western blot com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e peptídeo FIV-TM (não visualizada). Soros negativo (-) e positivo (+) para a infecção pelo FIV. M: Marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad<sup>®</sup>). As setas azul, preta e vermelha indicam reação contra os antígenos FIVp24/TM (~29,8 kDa), FIVp24C' (~26,4 kDa) e FIVp17C' (~16,4 kDa), respectivamente.

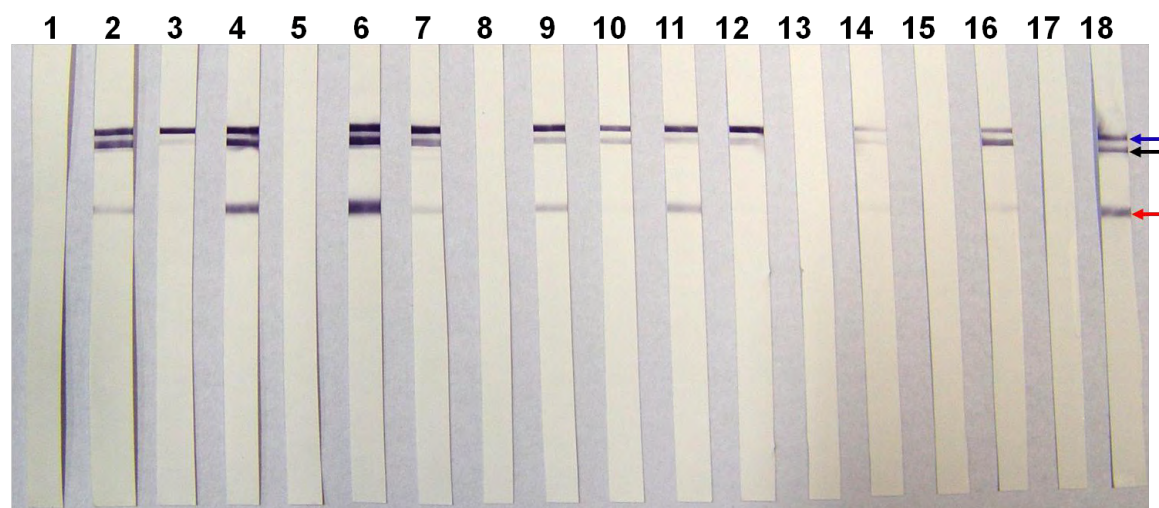
**TABELA 8:** Resultados do SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test e do ELISA indireto com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C' e FIV-TM.

| Amostra | SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV |      | ELISA indireto (A <sub>450</sub> ) |                 |                 |                | WB |
|---------|----------------------------|------|------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----|
|         | FIV                        | FeLV | p24/TM<br>(0,485)*                 | p24<br>(0,141)* | p17<br>(0,126)* | TM<br>(0,072)* |    |
| 1       | -                          | -    | 0,058                              | 0,074           | 0,110           | 0,095          | -  |
| 2       | +                          | -    | 1,999                              | 1,454           | 0,327           | 0,392          | +  |
| 3       | +                          | -    | 1,252                              | 0,057           | 0,068           | 0,204          | +  |
| 4       | +                          | -    | 2,177                              | 1,527           | 0,679           | 0,742          | +  |
| 5       | -                          | +    | 0,249                              | 0,131           | 0,103           | 0,117          | -  |
| 6       | +                          | -    | 2,369                              | 2,108           | 1,367           | 0,632          | +  |
| 7       | +                          | -    | 2,272                              | 0,545           | 0,218           | 1,389          | +  |
| 8       | -                          | -    | 0,431                              | 0,037           | 0,070           | 0,026          | -  |
| 9       | +                          | -    | 1,818                              | 0,238           | 0,183           | 0,398          | +  |
| 10      | +                          | -    | 0,948                              | 0,271           | 0,140           | 0,145          | +  |
| 11      | +                          | -    | 1,403                              | 0,046           | 0,288           | 0,314          | +  |
| 12      | +                          | -    | 1,626                              | 0,333           | 0,068           | 0,626          | +  |
| 13      | -                          | -    | 0,179                              | 0,079           | 0,067           | 0,022          | -  |
| 14      | +                          | -    | 0,729                              | 0,839           | 0,186           | 0,032          | +  |
| 15      | -                          | +    | 0,246                              | 0,043           | 0,058           | 0,022          | -  |
| 16      | +                          | +    | 0,980                              | 1,183           | 0,168           | 0,111          | +  |
| 17      | -                          | +    | 0,132                              | 0,058           | 0,052           | 0,023          | -  |
| 18      | +                          | +    | 1,823                              | 2,171           | 1,101           | 0,091          | +  |

\*: valor de ponto de corte

+: reação positiva

-: reação negativa



**FIGURA 52:** Western blot das amostras com os antígenos FIVp24/TM, FIVp24C', FIVp17C'. Tiras 1 a 18: amostras negativas (1, 5, 8, 13, 15 e 17) e positivas (demais tiras) para a infecção pelo FIV. As setas azul, preta e vermelha indicam reação contra os antígenos FIVp24/TM (~29,8 kDa), FIVp24C' (~26,45 kDa) e FIVp17C' (~16,4 kDa), respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

A produção de antígenos recombinantes do FIV foi realizada com sucesso e possibilitou o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico da infecção pelo FIV, através da detecção de anticorpos. Anteriormente, a proteína de fusão FIVp24/TM apresentou resultados promissores de antigenicidade e concordância com os resultados da PCR e SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test, apesar do pequeno número de amostras testadas (TANIWAKI, 2009). No entanto, para ter certeza que o uso do antígeno FIVp24/TM apresentava vantagens foi realizado a comparação de testes com o antígeno p24 e epítipo TM separados. A produção do peptídeo TM é difícil, pois possui tamanho molecular pequeno (apenas 14 aminoácidos), por isso foi utilizado o peptídeo sintético, enquanto que as proteínas p24 e p17 foram produzidas.

A amplificação dos fragmentos codificantes do antígeno p24 (FIVp24 BamHI/HindIII e FIVp24 NcoI/HindIII) foi realizada como descrito por Rosati et al. (2004), mas para a amplificação dos fragmentos codificantes do antígeno p17 (FIVp17 BamHI/HindIII e FIVp17 NcoI/HindIII) foi necessária padronização da reação (dados não mostrados). A utilização da técnica de *Touchdown* PCR mostrou ser eficiente para diminuir reação inespecífica, no entanto não foi visualizada amplificação do fragmento FIVp17 BamHI/HindIII no animal Camp (Figura 8). Isso pode ter ocorrido devido à falha na hibridização dos primers com o aumento da estringência da reação, por causa de diferenças na sequência de nucleotídeos nesse animal em relação ao animal Pequeno, que apresentou amplificação com banda do tamanho esperado (Figura 8).

Durante a clonagem do fragmento FIVp24 BamHI/HindIII foi preciso realizar a clonagem inicial no plasmídeo pGEM-T easy e posterior subclonagem no vetor de expressão pET28a, o que não foi necessário para os demais fragmentos. O tamanho do fragmento e a falha na linearização do plasmídeo não podem ter ocasionado essa dificuldade, uma vez que os outros fragmentos foram clonados com sucesso. Portanto, a única explicação encontrada foi a diferença na sequência (AAA) colocada antes da região de restrição pela enzima *HindIII* no *primer* FIVp24N'/Rev-HindIII (Tabela 1), em relação ao *primer* FIVp17N'/Rev-HindIII ou FIVp24C'/Rev-HindIII (AAT) e FIVp17C'/Rev-HindIII (TTT), que pode ter dificultado a digestão pela enzima. A

eficiência de clivagem por enzimas de restrição em regiões 5' das moléculas de DNA é baixa, por isso é recomendada a adição de nucleotídeos para possibilitar a digestão (SAMBROOK et al., 1989). A sequência de nucleotídeos acrescentada foi escolhida pela análise de formação de *hairpins* e dímeros de *primers*, além disso, foram escolhidos os nucleotídeos adenina (A) ou timina (T) pela menor chance de formação de *hairpins* ou ligações mais estáveis, pois não se desejava a hibridização da região 5' do *primer* (SAMBROOK et al., 1989).

A análise das sequências dos plasmídeos recombinantes, além de confirmar a orientação correta do fragmento inserido e verificar a fase de leitura da proteína e da cauda de histidina, foi útil para a seleção dos clones. O sequenciamento do plasmídeo recombinante pET28a-FIVp17 BamHI/HindIII clone 1 detectou a presença de uma sequência que codifica o códon de terminação UAG no meio da proteína de matriz, o que impossibilitou o uso deste clone. E, na primeira tentativa de clonagem dos fragmentos codificantes das proteínas p24 e p17 com cauda de histidina na porção C' terminal (dados não mostrados), foi identificada a geração de um códon de terminação (UAA) na região final das proteínas recombinantes, que impedia a expressão da cauda de histidina e impossibilitava a purificação das proteínas recombinantes.

A seleção dos clones foi realizada com base na identidade de aminoácidos em relação à sequência depositada no banco de dados (*GenBank*, número de acesso M59418). Mesmo existindo diferenças de aminoácidos entre os clones selecionados e as sequências encontradas no banco de dados (Tabela 3), isso provavelmente não prejudicou o reconhecimento de anticorpos presentes em gatos infectados pelo FIV. Isso porque, a mudança de apenas alguns aminoácidos não altera necessariamente a estrutura secundária do antígeno, outra porque esta região pode não se tratar de um epítipo imunodominante. Além disso, como os fragmentos clonados foram amplificados a partir de uma amostra do Brasil (subtipo B), há maior chance de ser mais semelhante aos vírus circulante em nosso país, onde até o momento só foi identificada a presença do subtipo B do FIV (CAXITO et al., 2006; LARA, et al., 2007; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010).

Apesar de existirem 5 subtipos do FIV bem caracterizados (A-E), não foi possível realizar a matriz de identidade com o subtipo E, pois não há sequência

completa desse subtipo no banco de dados. Como esperado, ao comparar as sequências dos clones selecionados com as sequências de referência dos subtipos A, B, C e D (Tabela 3), foi observada maior identidade de aminoácidos com o subtipo B, tanto na proteína p17 (96,2%), quanto na p24 (98,6%). Reid e colaboradores (1991) também relataram alta identidade de aminoácidos (97,5 a 98,1%) ao comparar sequências da p17 e p24 dos isolados Petaluma, Glasgow-8 e PPR, pertencentes ao subtipo A. A proteína p24 apresentou maior identidade de aminoácidos (91,9 a 98,6%) em relação à proteína p17 (84,4 a 96,2%). O que pode ser explicado pela proteína p24 apresentar seleção purificante (negativa), o que diminui a probabilidade de mudança e torna a região mais conservada, enquanto que a proteína p17 parece não sofrer influência de nenhum tipo de seleção (BURKALA e POSS, 2007).

Os protocolos de expressão e purificação mostraram ser eficientes, uma vez que permitiram a produção das proteínas recombinantes em quantidade suficiente para purificação a partir de apenas 100 mL de cultura. Com exceção da proteína FIVp17N' que não apresentou banda visível na fração solúvel no SDS-PAGE corado com Coomassie blue (Figura 24), todas as outras (FIVp17C', FIVp24C' e FIVp24N') apresentaram banda na fração solúvel (Figuras 21, 22 e 23). A solubilidade das proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* pode ser influenciada por vários fatores. A temperatura de 37 °C durante a indução pode causar o acúmulo de algumas proteínas em corpúsculos de inclusão, tornando-as insolúveis, enquanto que temperaturas abaixo de 30 °C podem aumentar a quantidade de proteínas recombinantes na fração solúvel (SCHEIN, 1989; SCHEIN e NOTEBORN, 1988). Todas as proteínas recombinantes produzidas durante o presente trabalho foram induzidas a temperatura de 25 °C, na tentativa de aumentar a solubilidade, exceto a proteína FIVp24/TM, que apesar das inúmeras tentativas (TANIWAKI, 2009) sempre apresentou formação de corpúsculos de inclusão. O aumento da concentração de proteínas recombinantes produzidas facilita a agregação e formação de corpúsculos de inclusão (SCHEIN, 1989), por isso foi utilizada apenas a concentração final de 0,1 mM de IPTG para a indução, visando produção mais lenta das proteínas. A solubilidade da proteína também depende da sequência de aminoácidos da proteína recombinante, onde a presença de resíduos de cisteína e prolina, e regiões de aminoácidos

hidrofóbicos podem aumentar a agregação de proteínas (SCHEIN, 1989). No entanto, nenhum desses fatores explica a menor solubilidade da proteína FIVp17N', uma vez que o protocolo utilizado foi o mesmo, e a sequência da proteína FIVp17C' é muito semelhante. Uma possível explicação é a posição da cauda de histidina. Nas proteínas FIVp17N' e FIVp24N' (Figuras 23 e 24), nota-se maior quantidade da proteína recombinante na porção insolúvel, o que não ocorre nas proteínas FIVp24C' e FIVp17C', onde observa-se quantidade igual ou maior na fração solúvel, respectivamente (Figuras 21 e 22). A cauda de histidina pode aumentar o rendimento da proteína e influenciar na solubilidade da proteína (MOHANTY e WIENER, 2004). Apesar do mecanismo não ser completamente elucidado, alguns trabalhos indicam que a cauda na porção N' terminal ajuda na solubilidade das proteínas devido à otimização do início da tradução por tornar a ligação do ribossomo mais eficiente (WAUGH, 2005). Porém, a melhor localização da cauda é proteína-específica, por isso deve ser testada individualmente (TERPE, 2003; DAN et al., 2009). Outros trabalhos indicam que a cauda C' terminal aumenta a estabilidade da proteína pela diminuição de degradação proteolítica (FORD et al., 1991). Isso foi observado na figura 45, onde a proteína FIVp24C' não apresentou sinais de degradação diferente da proteína FIVp24N'.

Apesar da diferença na solubilidade, todas as proteínas recombinantes apresentaram reatividade tanto na fração solúvel quanto na insolúvel ao realizar o teste de antigenicidade (Figuras 25 e 26). Além disso, observou-se alta reatividade do extrato total tratado com tampão de amostra de SDS-PAGE, que demonstra que todas as proteínas produzidas agem como epítopos lineares, uma vez que os anticorpos anti-FIV reconhecem as proteínas desnaturadas. Isso permitiu realizar a análise da especificidade, utilizando o Western blot com SDS-PAGE em condições desnaturantes, onde foi visualizada reação do soro positivo com presença de banda única de aproximadamente 18,3, 28,3, 16,4 e 26,4 kDa referente às proteínas FIVp17N', FIVp24N', FIVp17C' e FIVp24C', respectivamente (Figuras 30 e 31). Assim como, o desenvolvimento do teste de Western blot com proteínas recombinantes para a confirmação dos resultados do ELISA indireto.

Durante a padronização do ELISA indireto rápido, observou-se diminuição da reatividade do antígeno FIVp17N' (Figura 34), mas durante a

determinação da concentração do antígeno no ELISA indireto convencional, essa mesma proteína apresentava boa reatividade com apenas 50 ng/poço (Figura 32). Isso pode ter ocorrido devido a degradação da proteína como ocorreu na proteína FIVp24N' (Figura 45), como já discutido acima, uma vez que essa proteína foi produzida praticamente um ano antes do início dos testes do ELISA indireto rápido. Adicionalmente, após purificação da proteína FIVp17N', apenas uma fração apresentou a proteína numa concentração muito baixa (50 µg/mL). Por esses motivos, tanto a proteína FIVp17N' como a FIVp24N' não foram utilizadas nas etapas posteriores.

O antígeno FIV-TM apresentou menor reatividade no ELISA indireto rápido, necessitando uma concentração maior em número de moléculas/poço para atingir uma  $A_{450}$  de 1,5 (Figura 35). Isto pode ter acontecido devido a uma maior dificuldade de adsorção de pequenos peptídeos (FIV-TM possui apenas 14 aminoácidos) ou a sua conformação, que ao ser adsorvido na placa, não facilite a interação com os anticorpos presentes no soro. O soro positivo testado também poderia possuir apenas pequena quantidade de anticorpos anti-TM. No entanto, quando todos os soros FIV positivos foram testados, o antígeno FIV-TM apresentou a  $A_{450}$  máxima e  $A_{450}$  média de apenas 1,521 e 0,367, respectivamente, enquanto que todas as outras apresentaram  $A_{450}$  máxima acima de 2,0 e  $A_{450}$  média de 0,733 (Tabela 7), o que demonstra a sua baixa reatividade. Além disso, durante a padronização do Western blot não foi possível visualização de reatividade contra o antígeno FIV-TM. Uma provável explicação é o pequeno tamanho do peptídeo, que possui apenas 1,7 kDa, e sabe-se que a transferência de peptídeos é menos eficiente pela dificuldade da sua ligação à membrana de nitrocelulose. No entanto, após o início do uso do marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®), que possui um peptídeo de 2 kDa, foi observado que as condições de transferência de 45 min a 15 V estavam ótimas. A ligação do peptídeo do marcador pode ter sido facilitada pela presença do corante, além disso, as características químicas do peptídeo podem interferir na sua ligação à membrana.

No processamento das amostras apenas uma amostra apresentou resultado contraditório, onde no teste de SNAP® FIV/FelV Combo test anterior (realizado em outro projeto) o animal apresentava resultado positivo para a infecção pelo FIV e também pelo FeLV, mas que no ELISA indireto rápido com

antígeno FIVp24/TM apresentou absorvância intermediária ( $A_{450}=0,249$ ), sendo difícil determinar se era positivo ou negativo para a infecção pelo FIV. Portanto foi realizado outro teste com o SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test, que apresentou resultado negativo. Essa amostra foi considerada negativa no processamento das amostras, e a confirmação definitiva foi realizada com o Western blot com todos os antígenos (Figura 52, amostra 5). Além disso, todas as amostras consideradas positivas no SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test foram testadas e confirmadas no Western blot.

A comparação da reatividade entre os antígenos FIVp17C', FIVp24C', FIVp24/TM e FIV-TM foi realizada em número de cópias/poço, na tentativa de relacionar a quantidade de anticorpos circulantes contra cada antígeno. Apesar de não ser quantitativa, foi possível verificar uma correlação entre os valores de  $A_{450}$  de cada antígeno e os resultados do Western blot. Sugerindo que valores de  $A_{450}$  altos podem significar presença de maior quantidade de anticorpos contra determinado antígeno. Todos os antígenos testados apresentaram valores de concordância ótimos ( $k=0,94$  a  $1,0$ ), utilizando o melhor ponto de corte para cada antígeno e valores em  $A_{450}$  (Tabela 5). No entanto, é importante notar que os valores do ponto de corte para os antígenos FIVp17C' ( $A_{450}=0,126$ ), FIVp24C' ( $A_{450}=0,141$ ), e FIV-TM ( $A_{450}=0,072$ ) foram muito baixos (Tabela 7), pois algumas amostras positivas apresentaram baixa reatividade ( $A_{450}$  mín= $0,081$  a  $0,238$ ). Ao contrário, o antígeno FIVp24/TM mostrou reatividade superior, com  $A_{450}$  média de  $1,847$  e  $A_{450}$  mínima de  $0,729$ , sendo utilizado o ponto de corte de  $0,5$  (Tabela 7), o que facilita a diferenciação entre positivo e negativo. O aumento da reatividade do antígeno FIVp24/TM provavelmente se deve à fusão de dois importantes antígenos (p24 e epítipo TM). A associação de antígenos tem demonstrado melhorar a sensibilidade em testes de ELISA (MAHBOUDI et al., 2006; HARTMANN et al., 2007; ROSATI et al., 2004). Rosati e colaboradores (2004), utilizando o mesmo antígeno FIVp24/TM, observaram uma boa concordância ( $k=0,89$ ), enquanto que o antígeno FIVp24 obteve uma concordância moderada ( $k=0,55$ ). No ELISA indireto rápido padronizado com o antígeno FIVp24/TM e FIVp24, foi observada uma concordância ótima ( $k=1,0$  e  $k=0,98$ , respectivamente) com o SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test (IDEXX laboratories). Essa diferença pode ser explicada pelo tipo de teste considerado como referência durante a comparação entre

testes. Rosati e colaboradores (2004) utilizaram um teste imunocromatográfico que possui como antígeno o peptídeo TM sintético (FIV IC Agrolabo) e a soroneutralização para a classificação das amostras em positivo e negativo, portanto era esperado ocorrer maior concordância com a utilização do FIVp24/TM. Já o SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test (IDEXX laboratories) possui os antígenos p24 e gp40 (HARTMANN et al, 2007) ou p24 e p17 (CRAWFORD e LEVY, 2007).

Um teste diagnóstico ideal deve possuir alta sensibilidade e alta especificidade, com o intuito de evitar resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente (HARDY, 1991; JACOBSON, 1991). Isto é importante principalmente na infecção pelo FIV, pois uma vez infectado o animal nunca se recupera da infecção (HARTMAN, 1998). Portanto, uma alta sensibilidade é necessária para possibilitar a separação de um animal infectado de animais não infectados, e assim diminuir a disseminação da infecção e também dar tratamento especial a esses animais (SELLON e HARTMANN, 2006). E, apesar de gatos FIV positivos apresentarem uma fase assintomática longa, uma alta especificidade pode evitar a eutanásia de animais assim como a dificuldade de adoção em abrigos de animais devido a resultados falso-positivos, principalmente em regiões com baixa prevalência da doença (HOSIE et al., 2009). O teste de Western blot com antígenos recombinantes mostrou ser específico para detectar a infecção pelo FIV, pois nenhum animal negativo apresentou reação, o que é ideal para um teste confirmatório. Apesar das amostras FIV positivas apresentarem alta reatividade ( $A_{450} > 0,7$ ) contra o antígeno FIVp24/TM, a amostra 8 (negativa) apresentava valor de  $A_{450} = 0,431$ , o que parece alto, mas ao realizar o Western blot, não houve nenhum tipo de reação. Mesmo as amostras 5, 15 e 17, que são FeLV positivas, não apresentaram reação cruzada (Figura 52). Isso demonstra a possibilidade de diferenciar duas infecções causadas por vírus da mesma família e que podem levar a sinais clínicos muito semelhantes causados pela imunossupressão, mas que possuem resposta ao tratamento e prognóstico diferentes.

Normalmente o Western blot é utilizado como teste confirmatório, pois é uma técnica mais demorada e que impossibilita o processamento de muitas amostras. O teste desenvolvido foi extremamente útil para confirmar e elucidar os resultados do ELISA indireto rápido com as proteínas recombinantes

(Tabela 5 e 6). Com os resultados das reações pode-se inferir sobre o porquê do ELISA indireto com a proteína FIVp24/TM possuir resultados superiores (100% de concordância com o teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test). Durante a seleção das amostras a serem submetidas ao Western blot, foram escolhidas algumas amostras com valores de  $A_{450}$  altos para todos os antígenos (amostras 4 e 6), que apresentaram reação forte contra os 3 antígenos (FIVp24/TM, FIVp24C' e FIVp17C'). Mas foram selecionadas principalmente amostras que possuíam valores baixos ou negativos para alguns antígenos (Tabela 8). Na reação de Western blot foi demonstrado que as amostras 3, 10 e 12 não possuem anticorpos detectáveis que reagem com o antígeno FIVp17C' (Figura 52), o que está em concordância com o resultado do ELISA indireto, uma vez que essas amostras possuem valores de  $A_{450} > 0,150$ , apesar da amostra 10 ser considerado positiva utilizando o ponto de corte de  $A_{450} = 0,126$ . Além disso, houve reação fraca com as amostras 2, 7, 9, 11, 14 e 16, que apresentaram valores de  $A_{450}$  entre 0,168 a 0,327. Isso confirma a baixa reatividade contra o antígeno FIVp17C', o que não é interessante para o uso diagnóstico. O antígeno FIVp24C' mostrou maior reatividade no ELISA indireto em relação ao antígeno FIVp17C', porém algumas amostras selecionadas também possuíam valores de  $A_{450}$  baixos, por isso apresentaram reação fraca no Western blot (Figura 52). A amostra 3 era a única que apresentava resultado falso-negativo com o antígeno FIVp24C' ( $A_{450} = 0,057$ ) e ocasionava a diminuição da sensibilidade para 97,87%. No Western blot observou-se reação muito fraca contra o antígeno FIVp24C' e reação forte contra o antígeno FIVp24/TM (Figura 52). A associação do epítipo TM à proteína p24 é importante para o diagnóstico, pois alguns animais possivelmente não produzem anticorpos contra o antígeno p24 do FIV, assim como alguns não possuem anticorpos contra p17 ou TM, como observado anteriormente (EGBERINK et al., 1992). Todas as amostras positivas apresentaram reação contra a proteína FIVp24/TM, no entanto a amostra 14 apresentou reação fraca para todos os antígenos, o que não era esperado, pois ela possuía reação de  $A_{450}$  de 0,729 e 0,839, respectivamente para os antígenos FIVp24/TM e FIVp24C'. Contudo, o fato de possuir as 3 bandas de tamanho esperado já confirma a reação positiva, uma vez que a sensibilidade do Western blot é inferior ao do ELISA,

mas sua especificidade é alta. Posteriormente essa amostra foi retestada no Western blot e apresentou reação mais intensa (dados não mostrados).

Após determinar que o ELISA indireto rápido utilizando o antígeno FIVp24/TM possuía vantagens no diagnóstico da infecção pelo FIV, foi realizada a validação do teste. A validação de testes diagnósticos é necessária para avaliar a sua performance analítica e diagnóstica, e assim demonstrar a confiabilidade do teste desenvolvido (JACOBSON e ROMATOWSKI, 1996; JENSEN e KJELGAARD-HANSEN, 2010; OIE, 2010). A especificidade analítica do teste foi demonstrada pela ausência de reação cruzada com soros positivos apenas para a infecção pelo FeLV (20/110). O teste apresentou sensibilidade e especificidade relativa de 100%, mostrando alta acurácia. A precisão do teste foi observada pelos baixos valores de CV intra-teste (2,13 a 3,17%) e inter-teste (2,32 a 6,51%), sendo que valores de CV abaixo de 5% para testes automatizados e 10% para testes manuais são considerados ideais para testes diagnósticos (JENSEN e KJELGAARD-HANSEN, 2010).

Com o procedimento de ELISA indireto rápido, observou-se a diminuição do tempo de reação de 2 h 15 min no ELISA indireto convencional para 45 min. Isso oferece uma grande vantagem durante o processamento de amostras, pois facilita o procedimento e há a possibilidade de liberação mais rápida do resultado, o que é muito importante para o uso comercial do teste. A viabilidade do uso comercial do ELISA indireto rápido com antígeno FIVp24/TM também foi demonstrada pela manutenção da reatividade de antígeno durante 10 meses, principalmente com o uso de inibidores de proteases (Figura 38). Isso pode ser explicado pela possibilidade de existir proteases no leite em pó desnatado que degradaria o antígeno adsorvido. Infelizmente, notou-se queda na reatividade da IgG de coelho anti-IgG de gato, que seria usada como controle de reação para testar os reagentes do kit. No caso de diagnóstico de infecção pelo FIV o ideal seria comparar o soro teste com um soro positivo e negativo para a infecção. No entanto, seria inviável a produção em escala comercial desses soros de gatos. Por isso, a alternativa encontrada foi adsorver na placa de ELISA IgG de coelho anti-IgG de gato purificada, para capturar IgG de gato presente em qualquer soro teste. Uma vez capturada a IgG de gato, ela será reconhecida pelo conjugado anti-IgG de gato marcado com peroxidase e a reação ocorrerá com a adição do substrato/cromógeno.

Uma explicação para a menor estabilidade da IgG anti-gato em relação ao antígeno FIV p24/TM, é que o anticorpo precisa da sua estrutura íntegra para capturar a IgG de gato, ou seja a sua conformação é importante para o reconhecimento. Já o antígeno FIVp24/TM possui epítomos lineares, uma vez que durante a purificação ele sofre desnaturação e é reconhecido no Western blot realizado com condições desnaturantes. Como a diminuição da reatividade foi gradual até o quarto mês de armazenamento, e após esse período foi observado maior estabilidade, porém com uma absorvância baixa ( $A_{450} < 0,5$ ), uma alternativa seria colocar uma quantidade maior de IgG anti-IgG de gato durante a adsorção nas tiras de ELISA, assim mesmo que no início ocorra uma queda da reatividade, até o período de conservação das tiras poderá ser observado reação positiva.

No Brasil, o diagnóstico da infecção pelo FIV ainda não é amplamente realizado, uma vez que os testes diagnósticos disponíveis possuem alto custo por se tratarem de kits importados. Portanto, o desenvolvimento de testes sorológicos que possuem alta performance analítica e diagnóstica é de extrema importância, principalmente para determinar a real prevalência da doença no nosso país. Assim, o uso de antígenos recombinantes do FIV produzidos demonstrou ser útil tanto para realização de um teste de triagem (ELISA indireto rápido) como um teste confirmatório (Western blot). Além disso, os antígenos recombinantes produzidos possibilitam estudos de fatores de prognósticos e avaliação do curso da doença.

## 7. CONCLUSÕES

- Os antígenos recombinantes p24 e p17 do FIV foram produzidos com sucesso em sistema procarioto e permitiram a padronização do teste sorológico rápido (ELISA indireto rápido) e teste confirmatório (Western blot) para o diagnóstico da infecção pelo FIV.
- A cauda de histidina na porção carboxi terminal aumenta a solubilidade e a viabilidade das proteínas recombinantes produzidas.
- A comparação dos antígenos recombinantes no ELISA indireto mostra que a proteína de fusão FIVp24/TM possui reatividade superior, com 100% de concordância com o teste utilizado como referência.
- O ELISA indireto rápido com o antígeno FIVp24/TM possui características desejáveis para uso comercial, tais como alta precisão e longo período de manutenção da reatividade.

## 8. REFERÊNCIAS

ALLISON, R.W.; HOOVER, E.A. Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v.19, n.3, p.245-253, 2003.

AVRAMEAS, A.; STROSBURG, A.D.; MORAILLON, A.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection based on synthetic peptides from Env glycoproteins. *Res. Virol.* v.144, n.3, p.209-218, 1993.

BARR, M.C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, v.11, n.3, p.144-153, 1996.

BEATTY, J.A.; WILLETT, B.J.; GAULT, E.A.; JARRETT, O. A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J Virol.*, v.70, n.9, p.6199-206, 1996.

BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.8, n.1, p.87-112, 1995.

BIENZLE, D.; REGGETI, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Can. Vet. J.*, v.45, n.9, p.753-757, 2004.

BURKALA, E.; POSS, M. Evolution of feline immunodeficiency virus Gag proteins. *Virus genes*, v.35, n.2, p.251-264, 2007.

BURKHARD, M.J.; DEAN, G.A. Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Curr HIV Res.*, v.1, n.1, p.15-29, 2003.

CALDAS, A.P.F.; LEAL, E.S.; SILVA, E.F.A.; RAVAZZOLO, A.P. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, n.1, p.20-25, 2000.

CALANDRELLA, M.; MATTEUCCI, D.; MAZZETTI, P.; POLI, A. Densitometric analysis of Western blot assays for feline immunodeficiency virus antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.79, p.261-271, 2001.

CALLANAN, J.J.; THOMPSON, H.; TOTH, S.R.; O'NEIL, B.; LAWRENCE, C.E.; WILLETT, B.; JARRETT, O. Clinical and pathological findings in feline immunodeficiency virus experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.35, p.3-13, 1992.

CALZOLARI, M.; YOUNG, E.; COX, D.; DAVIS, D.; LUTZ, H. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.46, n. 1-2, p.83-92, 1995.

CAXITO, F.A.; COELHO, F.M.; OLIVEIRA, M.E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun*, v.30, n. 8, p.953-956, 2006.

CHONG, Y.H.; BALL, J.M.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C.; RUSHLOW, K.E. Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp45) of equine infectious anemia virus. *J Virol.*, v.65, n.2, p.1013-1018, 1991.

CRAWFORD, P.C.; LEVY, J.K. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.37, n.2, p.335-350, 2007.

CRAWFORD, P.C; SLATER, M.R., LEVY, J.K. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.226, n.9, p.1503-1507, 2005.

DAN, H.; BALACHANDRAN, A.; LIN, M. A pair of ligation-independent Escherichia coli expression vectors for rapid addition of a polyhistidine affinity tag to the N- or C-termini of recombinant proteins. *J. Biomol. Tech.*, v.20, n.5, p.241-248, 2009.

de RONDE, A.; STAM, J.G.; BOERS, P.; LANGEDIJK, H.; MELOEN, R.; HESSELINK, W.; KELDERMANS, L.C.E.J.M., vanVLIET, A.; VERSCHOOR, E.J.; HORZINEK, M.C.; EGBERINK, H.F. Antibody response in cats to the envelope proteins of feline immunodeficiency virus: identification of an immunodominant neutralization domain. *Virology*, v.198, p. 257-264, 1994.

DUARTE, A.; MARQUES, M.I.; TAVARES, L.; FEVEREIRO, M. Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. *Arch. Virol.*, v.147, n.5, p.1061-1070, 2002.

DUNHAM, S.P. Lessons from the cat: Development of vaccines against lentiviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.112, p.67-77, 2006.

EGBERINK, H.F.; KELDERMANS, C.E., KOOLEN, M.J.; HORZINEK, M.C. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am J Vet Res.*, v.53, n.7, p.1133-1138, 1992.

EGBERINK, H.F.; LUTZ, H.; HORZINEK, M.C. Use of western blot and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, n.10, p.1339-1342, 1991.

FONTENOT, J.D.; HOOVER, E.A.; ELDER, J.H.; MONTELARO, R.C. Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus

transmembrane peptides for serological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, n.7, p.1885-1890, 1992.

FORD, C.F.; SUOMINEN, I.; GLATZ, C.E. Fusion Tails for the Recovery and Purification of Recombinant Proteins. *Protein Expr Purif.*, v.2, p.95-107, 1991.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-98, 1999.

HARDY, W.D.Jr. General principles of retrovirus immunodetection tests. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, n.10, p.1282-1287, 1991.

HARTMANN, K.; WERNER, R.M.; EGBERINK, H.; JARRETT, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet. Rec.*, v.149, n.11, p.317-320, 2001.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet. J.*, v.155, n.2, p.123-137, 1998.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C.E.; VIDYASHANKAR, A.N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H.F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. *J. Feline Med. Surg.*, v.9, n.6, p.439-445, 2007.

HOHDATSU, T.; HIRABAYASHI, H.; MOTOKAWA, K.; KOYAMA, H. Comparative study of the cell tropism of feline immunodeficiency virus isolates of subtype A, B and D classified on the basis of the *env* gene V3-V5 sequence. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.93-100, 1996.

HOSIE, M.J.; BEATTY, J.A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus: setting the challenge. *Aust. Vet. J.*, v.85, p.5-12, 2007.

HOSIE, M.J.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ,

H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, v.11, n.7, p.575-584, 2009.

ICTVdB MANAGEMENT. 00.061.1.06. Lentivirus. In: *ICTVdB – The Universal Virus Database*, version 4, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>. Acesso em: 20 maio 2009.

JACOBSON, R.H. How well do serodiagnostic tests predict the infection or disease status of cats? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, n.10, p.1343-1347, 1991.

JACOBSON, R.H.; ROMATOWSKI, J. Assessing the validity of serodiagnostic test results. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, v.11, n.3, p.135-143, 1996.

JENSEN, A.L.; KJELGAARD-HANSEN, M. Diagnostic test validation. In: Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6. ed. Wiley-Blackwell, 2010. chap.130, p. 1027-1033.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J.K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. *J. Virol.*, v.69, n.6, p.3639-3646, 1995.

KOHMOTO, M.; UETSUKA, K.; IKEDA, Y.; INOSHIMA, Y.; SHIMOJIMA, M.; SATO, E.; INADA, G.; TOYOSAKI, T.; MIYAZAWA, T.; DOI, K.; MIKAMI, T. Eight-year observation and comparative study of specific pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus (FIV) subtypes A and B: terminal acquired immunodeficiency syndrome in a cat infected with FIV petaluma strain. *J. Vet. Med. Sci.*, v.60, n.3, p315-321, 1998.

KUSUHARA, H.; HOHDATSU, T.; SETA, T.; NEMOTO, K.; MOTOKAWA, K.; GEMMA, T.; WATANABE, R.; HUANG, C.; ARAI, S.; KOYAMA, H. Serological

differentiation of FIV-infected cats from dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine (Fel-O-Vax FIV) inoculated cats. *Vet. Microbiol.*, v. 120, p. 217-225, 2007.

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

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO JR, J.P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.11, p.467-470, 2007.

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO JR, J.P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Ciência Rural*, v.38, n.8, p.2245-2249, 2008.

LECOLLINET, S.; RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: The road not taken. *Comparat. Immunol. Microbiol. Infect.*, v.31, p.167-190, 2008.

LEVY J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K., HOFMANN-LEHMANN, R., LITTLE, S., SUNDAHL, E., THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J. Feline Med. Surg.*, v.10, n.3, p.300-316, 2008.

LEVY, J.K.; CRAWFORD, P.C.; SLATER, M.R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 225, n.10, p. 1558-1561, 2004.

LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.228, n.3, p.371-376, 2006.

MAHBOUDI, F.; IRINA, N.A.; CHEVALIER, A.; GHADIRI, A.; ADELI, A.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; BARKHORDARI, F.; FARZAMFAR, B.; ALINEJAD, M. A serological assay of human immunodeficiency virus type 1 antibodies based on recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, v.125, n.2, p.295-303, 2006.

MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P.; SCHATZMAYR, H.G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R.M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Virol.*, v.82, n.16, p.7863-7874, 2008.

MEDEIROS, S.D.; MARTINS, A.; DIAS, C.G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R.D. Natural transmission of feline immunodeficiency virus from infected queen to kitten. *Virol. J.*, v.9, n.99, p.2-7, 2012. doi: 10.1186/1743-422X-9-99.

MERMER, B.; HILLMAN, P.; HARRIS, R.; KROGMANN, T.; TONELLI, Q.; PALIN, W.; ANDERSEN, P. A recombinant-based feline immunodeficiency virus antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.35, n.1-2, p.133-141, 1992.

MOHANTY, A.K.; WIENER, M.C. Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position. *Protein Expr. Purif.*, v.33, p.311–325, 2004.

MÜNK, C.; HECHLER, T.; CHAREZA, S.; LÖCHELT, M. Restriction of feline retroviruses: lessons from cat APOBEC3 cytidine deaminases and TRIM5alpha proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.34, p.14-24, 2010.

NAKAMURA, K.; SUZUKI, Y.; IKEO, K.; IKEDA, Y.; SATO, E.; NGUYEN, N.T.; GOJOBORI, T.; MIKAMI, T.; MIYAZAWA, T. Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Arch. Virol.*, v.148, n.4, p.789-791, 2003.

NOVAGEN. TB074 - pET28a-c(+) vectors, 1998. Disponível em : <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf> Acesso em 01 junho de 2009.

OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2010*. Disponível em: [http://web.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/1.1.04\\_VALID.pdf](http://web.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/1.1.04_VALID.pdf). Acesso em 20 maio 2011.

O'NEIL, L.L.; BURKHARD, M.J.; DIEHL, L.J.; HOOVER, E.A. Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, v.10, n.4, p.266-278, 1995.

PECORARO, M.R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M.E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, v.77, p. 2031-2035, 1996.

PEDERSEN, N.C.; BARLOUGH, J.E. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 199, n.10, p.1298-1305, 1991.

PEDERSEN, N.C.; HO, E.W.; BROWN, M.L.; YAMAMOTO, J.K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*, v.235, p.790-793, 1987.

PROMEGA. Technical manual TM042, 2009. pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector systems. Disponível em: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf> Acesso em: 01 julho de 2009.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M.K.; LUCAS, S.R.R. Clinical study of acquire immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci*, v.34, n.3, p.152-155, 1997.

REID, G.; RIGBY, M.A.; MCDONALD, M.; HOSIE, M.J.; NEIL, J.C.; JARRETT, O. Immunodiagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant viral p17 and p24. *AIDS*, v.5, n.12, p.1477-1483, 1991.

RICHARDS, J.R. Feline immunodeficiency virus vaccine: Implications for diagnostic testing and disease management. *Biologicals*, v. 33, p. 215-217, 2005.

RICHARDS, J.R.; ELSTON, T.H.; FORD, R.B.; GASKELL, R.M.; HARTMANN, K.; HURLEY, K.F.; LAPPIN, M.R.; LEVY, J.K.; RODAN, I.; SCHERK, M.; SCHULTZ, R.D.; SPARKES, A.H. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel Report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.229, n.9, p.1405-1441, 2006.

ROSATI, S.; PROFITI, M.; LORENZETTI, R.; BANDECCHI, P.; MANNELLI, A.; ORTOFFI, M.; TOLARI, F.; CIABATTI, I.M. Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis. *J. Virol. Methods*, v. 121, n.1, p.73-78, 2004.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. protoc.*, v.1, n.1, p16-22, 2006.

SCHEIN, C.H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technol*, v.7, p.1141-1149, 1989.

SCHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technol.*, v.6, p.291-294, 1988.

SELLON, R.K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In: GREENE, C.E. *Infectious disease of the dog and cat*. 3.ed. Georgia: Elsevier, 2006. chap.14, p.131-143.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SOBRINHO, L.S.V.; VIDES, J.P.; BRAGA, E.T.; GOMES, A.A.D.; ROSSI, C.N.; MARCONDES, M. Sorofrequência de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina em gatos do município de Araçatuba, São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 48, n.5, p.378-383, 2011.

SPENCER, K.A.; OSORIO, F.A.; HISCOX, J.A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. *Vaccine*, v.25, n.30, p.5653-5659, 2007.

STEINMAN, R.; DOMBROWSKI, J.; O'CONNOR, T.; MONTELARO, R.C.; TONELLI, Q.; LAWRENCE, K.; SEYMOUR, C.; GOODNESS, J.; PEDERSEN, N.C.; ANDERSEN, P.R. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of feline immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, v.71, p.701-706, 1990.

TALBOTT, R.L.; SPARGER, E.E.; LOVELACE, K.M.; FITCH, W.M.; PEDERSEN, N.C.; LUCIW, P.A.; ELDER, J.H. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86, p.5743-5747, 1989.

TANIWAKI, S.A. *Clonagem e expressão da proteína de capsídeo/epítopo transmembrana do vírus da imunodeficiência felina para utilização no diagnóstico sorológico*. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

TANIWAKI, S.A.; LARA, V.M.; ARAÚJO JR., J.P. Estudo da frequência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina pela nested-PCR. *In: Mostra*

*Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 6., UNESP, Botucatu, 2002.*

TEIXEIRA, B.M.; LOGAN, N.; CRUZ, J.C.M.; REIS, J.K.P.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; HAGIWARA, M.K.; WILLETT, B.J.; HOSIE, M.J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus., *Arch Virol.*, v.155, n.3, p.379-384, 2010.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.60, n.5, p.523-533, 2003.

TOMPKINS, M.B.; BULL, M.E.; DOW, J.L.; BALL, J.M.; COLLISSON, E.W.; WINSLOW, B.J.; PHADKE, A.P.; VAHLENKAMP, T.W.; TOMPKINS, W.A. Feline immunodeficiency virus infection is characterized by B7+CTLA4+ T cell apoptosis. *J Infect Dis.*, v.185, n.8, p.1077-1093, 2002.

TOMPKINS, M.B.; TOMPKINS, W.A. Lentivirus-induced immune dysregulation., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.123, p.45-55, 2008.

VERSCHOOR, E.J.; van VLIET, A.L.; EGBERINK, H.F.; HESSELINK, W.; HORZINEK, M.C.; de RONDE, A. Expression of feline immunodeficiency virus gag and env precursor proteins in *Spodoptera frugiperda* cells and their use in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.1, n.9, p.2350–2355, 1993.

WAUGH, D. S. Making the most of affinity tags. *Trends biotechnol.*, v.23, n.6, p.316-320, 2005.

ZANUTTO, M.S.; FROES, T.R.; TEIXEIRA, A.L.; S, HAGIWARA, M.K. Características clínicas da fase aguda da infecção experimental de felinos pelo vírus da imunodeficiência felina. *Pesq. Vet. Braz.*, v.31, n. 3, p.255-260, 2011.

## 9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho foi submetido para publicação na revista *Journal of Virological Methods*, que se trata de uma revista internacional com fator de impacto 2.011, na categoria ISI de Ciências Veterinárias, que publica artigos com técnicas utilizadas em virologia. O texto foi redigido seguindo as instruções dos editores, com exceção das figuras e tabelas que foram apresentadas no corpo do texto para facilitar a visualização. O texto deve ser redigido em coluna única, com layout mais simples possível. Maiores informações podem ser obtidas através do site <http://www.journals.elsevier.com/journal-of-virological-methods/>

**Validation of an indirect ELISA for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using a recombinant capsid protein/transmembrane epitope**

S.A. Taniwaki <sup>a</sup>; A.S. Hora <sup>b</sup>; M.K. Hagiwara <sup>c</sup>; J.P. Araujo Jr <sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 18618-970, São Paulo, Brazil; [staniwaki@bol.com.br](mailto:staniwaki@bol.com.br)

<sup>b</sup> Department of Clinical Veterinary Science, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 05508-270, São Paulo, Brazil; [alineshora@gmail.com](mailto:alineshora@gmail.com)

<sup>c</sup> Department of Clinical Veterinary Science, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 05508-270, São Paulo, Brazil; [mitika.hagiwara@gmail.com](mailto:mitika.hagiwara@gmail.com)

<sup>d</sup> Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 18618-970, São Paulo, Brazil; [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)

\* Correspondent author:

João Pessoa Araújo Jr.

Tel.: +551438800422.

E-mail address: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br).

Complete correspondence address: Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n, Botucatu-SP, Brazil, 18618-970. E-mail: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)

## Abstract

The detection of circulating antibodies against feline immunodeficiency virus (FIV) is directly correlated with viral infection because the virus causes a persistent infection. This study aimed to validate an indirect ELISA based on a recombinant antigen formed by the viral capsid protein (p24) fused to the transmembrane (TM) epitope of FIV (FIVp24/TM). To prepare the recombinant antigen, proviral DNA from the peripheral blood of a naturally infected cat was used as the template for the amplification of the entire fragment that encodes p24 fused with the TM epitope sequence. This fragment was cloned, expressed and purified. The specificity of the FIVp24/TM antigen was confirmed by Western blotting using sera from FIV-positive and FIV-negative cats and feline leukaemia virus (FeLV)-positive cats. The relative sensitivity and specificity analyses were performed with 100-fold-diluted positive (n=47) and negative (n=63) serum samples, including FeLV-positive samples, that had been previously tested with the SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test. The cutoff value for the ELISA was calculated as the mean of the negative samples plus six standard deviations, and the results of the two tests showed 100% agreement (k=1.0). The negative results for all FeLV-positive samples (20/110) confirmed the analytical specificity of the assay. Dilutions of a positive sample representing high, medium and low concentrations of anti-FIV antibodies were used to calculate the intra- and inter-assay precision values. The intra-assay coefficient of variation (CV), which was determined with 14 replicates, ranged from 2.13 to 3.17%, and the inter-assay CV ranged from 2.32 to 6.51%. ELISA strips adsorbed with FIVp24/TM antigen did not lose reactivity after storage for 10 months at 8 °C, and therefore, this assay could be developed commercially. The analytical performance of the standardised FIVp24/TM indirect ELISA indicated that it can be used to determine the FIV infection status in cats.

**Keywords:** Feline immunodeficiency virus; recombinant antigen; capsid protein; transmembrane epitope; indirect ELISA

## 1. Introduction

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a member of the *Retroviridae* family, genus *Lentivirus*, and causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in cats, a disease similar to that caused by human immunodeficiency virus (HIV) infection in humans (Hartmann, 1998; ICTVdB, 2006). The virus, isolated from domestic cats, is classified into five well-characterised subtypes (A-E), and some inter-subtype FIV recombinants have been identified (Duarte et al., 2006; Hohdatsu et al., 1996; Kakinuma et al., 1995; Nakamura et al., 2003; Pecoraro et al., 1996). FIV is detected worldwide and infects both domestic and wild felids (Hartmann, 1998). The prevalence of infection varies from 1% to 44% depending on the health status of the cats investigated and the region where the study is performed (Hartmann, 1998; Hartmann et al., 2007; Lara et al., 2008; Levy et al., 2006).

Infected cats exhibit a variety of non-specific clinical signs, and therefore, a specific laboratory assay is necessary to confirm the diagnosis of FIV infection. The detection of anti-FIV antibodies is directly correlated with viral infection because once a cat has been infected, it will remain infected for life (Pedersen and Barlough, 1991). Commercially available serological tests, such as ELISAs and immunochromatography assays, are widely used because they are easy to use for routine diagnostic testing, and Western blotting is used as a confirmatory test (Crawford and Levy, 2007; Hartmann et al., 2007; Hosie et al., 2009).

The first generation of FIV ELISAs used purified whole inactivated virus obtained from cell culture. Since the advent of recombinant DNA technology, peptides and proteins have been produced in heterologous systems (prokaryotes or eukaryotes) and used for the detection of antibodies against individual viral proteins or individual epitopes (Hartmann et al., 2001; Spencer et al., 2007). Many recombinant FIV antigens have been used, either individually or in combination, to develop an assay with high diagnostic sensitivity and specificity. High diagnostic sensitivity and specificity are especially important for the detection of FIV infection, which has a low prevalence in the population (Calzolari et al., 1995; Hartmann et al., 2001).

Rosati et al. (2004) showed that an assay using a recombinant fusion protein composed of the capsid antigen and the transmembrane epitope (FIVp24/TM) had a high sensitivity. The FIV capsid antigen (p24) is the major core protein and is highly conserved within each viral group (Egberink et al., 1991; Reid et al., 1991; Mermer et

al., 1992). The FIV transmembrane glycoprotein (gp40) has an immunodominant epitope between two cysteine residues that induces a strong antibody response during FIV infection (Avrameas et al., 1993; de Ronde et al., 1994; Rosati et al., 2004). The purpose of the current study was to validate an indirect ELISA based on the recombinant FIVp24/TM antigen for the diagnosis of FIV infection in domestic cats.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Samples

All experiments were performed according to the guidelines of the Univ. Estadual Paulista (UNESP) Institutional Animal Care and Use Committee (58/2007-CEEA and 130/2009-CEUA). A whole blood sample from a naturally infected cat with subtype B FIV was collected for DNA extraction. For the development and validation of the indirect ELISA, serum samples from 110 cats, including FIV-positive cats, FIV-negative cats and feline leukaemia virus (FeLV)-positive cats, were used.

### 2.2. Amplification, cloning and sequencing of the FIV capsid/transmembrane epitope sequence

DNA was extracted using the GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit® (Amersham Pharmacia Biotech®) according to the manufacturer's protocol. The coding region of the FIV capsid fused with the transmembrane epitope (FIVp24/TM) was amplified with the primers described by Rosati et al. (2004). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 50 µL containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.6), 50 mmol/L KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP (Invitrogen), 0.4 µM each forward and reverse primer, 1 U of Fidelity™ DNA polymerase (USB®) and 10 µL of the DNA sample. Amplification was performed in a Mastercycler Thermal Cycler (Eppendorf) using the conditions described by Rosati et al. (2004). The PCR products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System kit (Promega) after electrophoresis and quantified in comparison with the Low DNA Mass Ladder standard (Invitrogen) using an 1.5% agarose gel stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). The FIVp24/TM fragment was cloned into the pGEM®-T Easy Vector (Promega®) and transformed into *Escherichia coli* DH5α cells, as recommend by the

manufacturer. This fragment was then subcloned into the pET28a expression vector (Novagen<sup>®</sup>) in frame with a 6×His N-terminal tag using *E. coli* BL21(DE) according to the manufacturer's instructions. The nucleotide sequence of the recombinant plasmid was verified by DNA sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems). The identity values of the recombinant capsid amino acid sequences in comparison with reference sequences for FIV subtypes A (Petaluma), B (TM-2), C (BM3070) and D (Shizuoka) from GenBank (accession numbers M25381, M59418, AF474246 and AY679785, respectively) were calculated using the BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 (Hall, 1999).

### 2.3. Expression and purification of the recombinant FIVp24/TM antigen

The *E. coli* BL21(DE) strain containing the recombinant plasmid pET28a-FIVp24/TM was grown at 37 °C with shaking (200 rpm) in Luria Bertani (LB) medium containing 30 µg/mL kanamycin. When the absorbance at 600 nm (Abs<sub>600</sub>) reached 0.5-0.8, the culture was induced overnight with 0.1 mM isopropyl 1 β-thiogalactopyranoside with shaking (200 rpm) at 30 °C. Bacterial cells were centrifuged at 3000 × g for 15 min at 4 °C, washed twice with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and resuspended in 0,1 culture volume of lysis buffer (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, and 1 mg/mL lysozyme) containing Sigma FAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA free (Sigma Aldrich). The bacterial lysate was kept on ice for 15 min, sonicated (5 cycles of 30 sec on, 60 sec off, amplitude 20%) and centrifuged at 3000 × g for 15 min at 4 °C. The soluble fraction was separated, and the pellet was resuspended in 0.1 culture volume of denaturing buffer (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, and 8 M urea) containing Sigma FAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA free (Sigma Aldrich). After centrifugation at 3000 × g for 15 min at 4 °C, the insoluble fraction was filtered through a Millex<sup>®</sup> GP 0.22 µm filter (Millipore<sup>®</sup>). The FIVp24/TM protein was purified from the insoluble fraction with a HisTrap<sup>™</sup> HP affinity column (GE Healthcare Life Science) using an ÄKTApurifier<sup>™</sup> chromatography system (GE Healthcare Life Science) according to the manufacturer's instructions. Fractions eluted with a semi-continuous gradient (from 20 mM to 500 mM imidazole) were analysed by SDS-PAGE (Laemmli,

1970), and the protein concentration was estimated using the BCA assay with a standard curve constructed using BSA (Smith *et al.*, 1985).

#### 2.4. Specificity of the FIVp24/TM antigen

The purified FIVp24/TM antigen was subjected to SDS-PAGE on a 16% Tris-tricine gel (Schägger, 2006) and transferred to a 0.1 µm nitrocellulose membrane (Protran<sup>TM</sup>-Whatman) using a Trans-Blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio Rad<sup>®</sup>). The membrane was cut into strips and blocked with 10% (w/v) nonfat dried milk in Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl) overnight at room temperature. The specificity of the recombinant antigen was verified by Western blotting analysis using FeLV-positive, FIV-positive and FIV-negative sera. The reagent strips were washed 3 times with TBS, coated with serum diluted 1:100 in TBS with 10% (w/v) nonfat dried milk and incubated for 1 h 30 min at room temperature with agitation. Following 2 washes of 10 min with TBS, a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-cat IgG diluted 1:200 in TBS containing 10% (w/v) nonfat dried milk was added to the strips, which were then incubated for another 1 h 30 min at room temperature with shaking. After 3 washes of 10 min with TBS, the reaction was visualised using 4-chloro-1-naphthol.

#### 2.5. Indirect ELISA procedure

Nunc-Immuno<sup>TM</sup> 96-well flat-bottom microtitre plates or 8-well flat strips were coated with 100 µL of recombinant FIVp24/TM antigen diluted in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) at a concentration of 100 ng per well (1 µg/mL). Between all reaction steps, the plates or strips were washed 5 times with 0.01 M PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween-20 (PBST). The antigen was adsorbed overnight at 4 °C and blocked with 300 µL of 10% (w/v) nonfat dried milk in PBST for 1 h at 37 °C. After the addition of 100 µL of cat serum diluted 1:100 in PBST containing 10% (w/v) nonfat dried milk, the plates or strips were incubated for 15 min at 37 °C. Then, 100 µL of HRP-conjugated rabbit anti-cat IgG diluted 1:1000 in PBST containing 10% (w/v) nonfat dried milk was added, and the plates or strips were incubated for 15 min at 37 °C. The colourimetric reaction was developed with 100 µL of the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA (Sigma Aldrich) for

15 min at room temperature with gentle agitation. The reaction was stopped with the addition of 50  $\mu$ L of 2 N HCl, and the absorbance values at 450 nm ( $A_{450}$ ) were measured using a Multiskan EX ELISA reader (Labsystems).

## *2.6. Determination of the cutoff value*

Sixty-three FIV-negative serum samples were used to determine the cutoff value for the indirect ELISA using the FIVp24/TM antigen. The cutoff values were calculated as the mean  $A_{450}$  value of the negative samples plus 3 to 7 standard deviations.

## *2.7. Sensitivity and specificity of the FIVp24/TM indirect ELISA*

The performance of the indirect ELISA using recombinant FIVp24/TM antigen was compared with the SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo test (IDEXX Laboratories). The commercial test was performed according to the manufacturer's instructions. To evaluate the relative sensitivity (rSe) and specificity (rSp) of the assay, serum samples from 110 cats were tested. The kappa ( $\kappa$ ) statistical method was used to evaluate the index of agreement between the two tests. Sera from cats naturally infected with FeLV were used to verify the analytical specificity of the standardised assay. The specificity of all positive reactions was confirmed by Western blot analysis using recombinant FIVp24/TM, as described in subsection 1.4.

## *2.8. Stability of the FIVp24/TM antigen*

For the stability assay, antigen-adsorbed 8-well flat strips (Nunc-Immuno<sup>™</sup> modules) were blocked with 10% (w/v) nonfat dried milk in PBST containing Sigma FAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA free (Sigma Aldrich) for 1 h at 37 °C. After the washing step, the strips were dried overnight at 4 °C, sealed and stored at 4 °C until use. The stability of the FIVp24/TM antigen was verified monthly over 10 months using FIV-positive and FIV-negative serum samples.

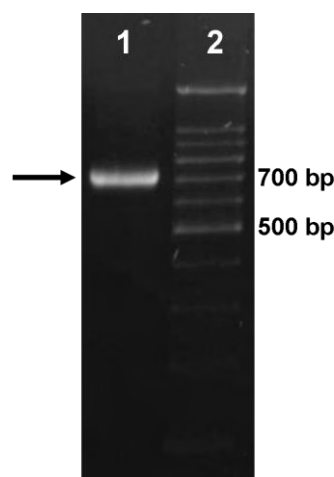
## *2.9. Repeatability of the FIVp24/TM indirect ELISA*

Internal quality control for the FIVp24/TM indirect ELISA was performed using a repeatability evaluation with adsorbed 8-well flat strips stored as described in subsection 2.8. An FIV-positive sample diluted 1:5, 1:10 and 1:15 in PBS was used to evaluate the performance of the test with different concentrations of antibodies. To assess the intra-assay (within-run) repeatability, 14 replicates of each dilution and undiluted FIV-positive samples were tested on the same day. To assess the inter-assay (between-run) repeatability, the same samples were run in duplicate on 5 different occasions. The coefficient of variation (CV) was calculated using the standard deviation (SD) and mean  $A_{450} (\bar{x})$  using the formula  $CV = (SD \times 100\%) / \bar{x}$ .

### 3. Results

#### 3.1. Amplification, cloning and sequencing of the FIV capsid/transmembrane epitope sequence

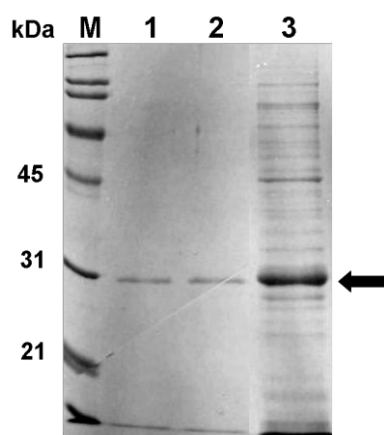
The amplification of the coding sequence of the FIV capsid fused with the TM epitope yielded a fragment of the expected size of approximately 727 bp (Fig. 1). The fragment was purified, cloned and subcloned into the pET28a expression vector. Nucleotide sequence analysis of the recombinant plasmid confirmed the correct reading frame of the insert and the 6×His N-terminal tag. The amino acid sequence of recombinant FIVp24 showed high identity with sequences of the TM-2 (97.7%), Shizuoka (95.5%), Petaluma (93.7%) and BM3070 (91.0%) isolates.



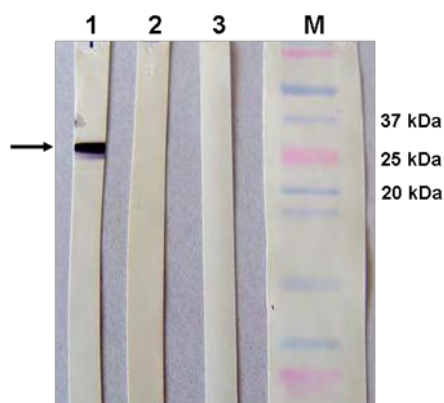
**Fig. 1.** Amplification of the coding sequence of the FIV capsid fused with the TM epitope. Lane 1: FIVp24/TM fragment of approximately 727 bp (indicated by an arrow); lane 2: LowRanger 100 bp DNA ladder (Norgen®).

### 3.2. Expression, purification and specificity of recombinant FIVp24/TM antigen

As described by Rosati et al. (2004), the recombinant FIVp24/TM protein was localised in the insoluble fraction. SDS-PAGE analysis demonstrated the efficiency of the expression and purification procedure (Fig. 2). A single fusion protein band was obtained with the expected molecular weight of approximately 29.8 kDa (Fig. 2). The specificity of the recombinant FIVp24/TM antigen was confirmed by a Western blotting assay (Fig. 3). The FIVp24/TM antigen reacted only with FIV-positive serum, and no reactions were observed with FeLV-positive or FIV-negative serum samples (Fig. 3).



**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of the FIVp24/TM protein. M: SDS-PAGE Standards/Broad Range protein marker (Bio-Rad®); lanes 1 and 2: purified fractions of the FIVp24/TM protein; lane 3: insoluble fraction before purification. The arrow indicates the band of the expected size of approximately 30 kDa. Conditions: 12.5% separation gel stained with Coomassie blue.



**Fig. 3.** Specificity of the FIVp24/TM antigen. Lane 1: FIV-positive serum; lane 2: FIV/FeLV-negative serum; lane 3: FeLV-positive serum. M: Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad®). The arrow indicates the positive reaction with a band of the expected size of approximately 30 kDa.

### 3.3. Cutoff value for the FIVp24/TM indirect ELISA

The average  $A_{450}$  value of 63 negative serum samples was 0.071, with a range of 0 to 0.431, and the calculated SD was 0.069. Only one sample had an  $A_{450}$  value greater than 0.278 (mean plus 3 SDs). However, the cutoff value of 0.5 (mean plus 6 SDs) was used because the lowest  $A_{450}$  value of the positive samples was 0.729.

### 3.4. Sensitivity and specificity of the FIVp24/TM indirect ELISA

The results of the indirect ELISA using recombinant FIVp24/TM antigen and the SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test (IDEXX laboratories) from 110 serum samples are shown in Table 1. The agreement between the tests was 100% ( $\kappa=1$ , rSe=100% and rSp=100%). Analytical specificity was confirmed by negative results for all sera from cats infected with FeLV that were not co-infected with FIV (21/110). All positive results were confirmed by Western blot analysis.

**Table 1**

Results of the FIVp24/TM indirect ELISA and the SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test (IDEXX laboratories).

| FIVp24/<br>TM | SNAP <sup>®</sup> FIV/FelV Combo test |        |            |            | Total |
|---------------|---------------------------------------|--------|------------|------------|-------|
|               | FIV +                                 | FeLV + | FIV/FeLV + | FIV/FeLV - |       |
| Positive      | 41                                    | 0      | 6          | 0          | 47    |
| Negative      | 0                                     | 20     | 0          | 43         | 63    |
| Total         | 41                                    | 20     | 6          | 43         | 110   |

+: positive

-: negative

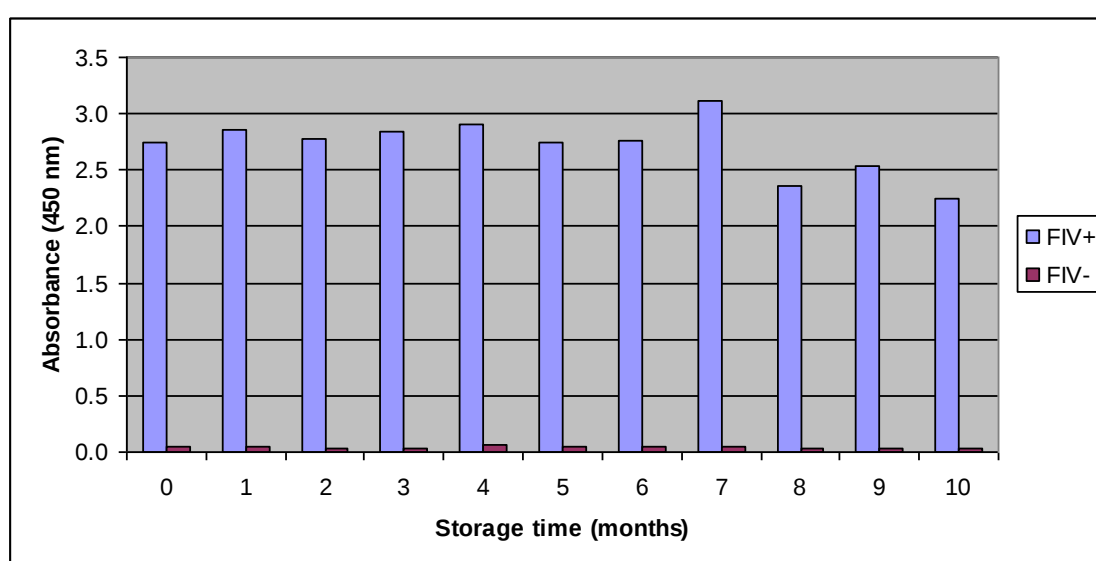
### 3.5. Stability of the FIVp24/TM antigen

The adsorbed FIVp24/TM antigen showed good stability over 10 months of storage at 4 °C. The reactivity of the recombinant antigen remained high, with an  $A_{450}$

value greater than 2.0, when testing an FIV-positive sample in the presence of protease inhibitors (Fig. 4).

### 3.6. Repeatability of the FIVp24/TM indirect ELISA

The intra-assay CV ranged from 2.13 to 3.17%, and the inter-assay CV ranged from 2.32 to 6.51%. These data indicate that there was little variation within or between runs using sample dilutions representing high, medium and low antibody concentrations, with  $A_{450}$  values from 3.0 to 0.7.



**Fig. 4.** Stability of the FIVp24/TM antigen during storage at 4 °C.

## 4. Discussion

The indirect ELISA using recombinant FIVp24/TM has a high relative sensitivity and specificity. The increase in the reactivity of the FIVp24/TM antigen was most likely achieved by the fusion of the two most important FIV antigens (p24 and the TM epitope). The combination of antigens in ELISAs has been shown to improve sensitivity (Mahboudi et al., 2006; Hartmann et al., 2007; Rosati et al., 2004). For humans, the detection of anti-HIV antibodies using recombinant p24-gp41 fusion proteins showed 100% sensitivity and 99.5% specificity (Mahboudi et al., 2006). We observed that assays using FIV p24 and the TM peptide separately had sensitivities of 97.87 and 85.11% and specificities of 100 and 98.41%, respectively (data not show).

Only one cat serum sample did not react with the p24 antigen but had positive reactions in the SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test and the FIVp24/TM indirect ELISA. The positive status of this cat was confirmed by PCR and Western blotting with FIVp24/TM. This result confirmed that the combined use of the TM epitope and the p24 protein increases the sensitivity of the assay, most likely because some cats do not produce antibodies against p24. Some animals show reactions against the transmembrane glycoprotein, justifying the incorporation of the TM antigen into diagnostic tests (Avrameas et al., 1993; Egberink et al., 1992). Rosati et al. (2004) observed a good correlation ( $k=0.89$ ) using the FIVp24/TM antigen, whereas we observed the maximum correlation ( $k=1.0$ ). This difference could be explained by the type of test used for comparison. In this study, we used the SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo test, which uses p24 and gp40 antigens and has a sensitivity of 100% and a specificity of 99.6% (Hartmann et al, 2007; Hosie et al., 2009). Rosati et al. (2004) used an immunochromatographic assay (FIV IC Agrolabo) based on the TM peptide and a seroneutralisation test.

A comparison of the amino acid sequence of the FIVp24/TM antigen with reference sequences of FIV subtypes A, B, C and D showed high identity (91.0 to 97.7%). As expected, greater identity was observed with subtype B, which is the only subtype reported to circulate in Brazil (Caxito et al., 2006; Lara et al., 2007; Martins et al., 2008; Teixeira et al., 2010). The p24 protein is conserved because it is under purifying selection, which reduces the probability of changes in the sequence (Burkala and Poss, 2007). A high level of sequence identity between the ELISA antigen and all FIV subtypes is important to allow for the detection of antibodies in cats infected with any subtype.

In addition to high diagnostic performance, the FIVp24/TM indirect ELISA showed good analytical performance with high precision, as indicated by the low CV values in the intra- and inter-assay evaluations. The analytical specificity of the assay was demonstrated by its ability to differentiate FIV and FeLV infections. FIV and FeLV are both retroviruses that infect cats and cause similar clinical signs of immunodeficiency (Hartmann et al., 2007). The ability of the assay to distinguish between these viruses is essential to improve the management of infected cats because infections with these two viruses have different prognoses and treatment responses. Moreover, the FIVp24/TM protein demonstrated was shown to retain antigenicity during long-term storage. This indirect ELISA was also standardised to allow the test to be completed in a short time (approximately 45 min). Therefore, this FIVp24/TM

indirect ELISA could be useful as a diagnostic assay for FIV infection in domestic cats because this assay shows high diagnostic and analytical performance.

### Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2007/53557-1, 2009/52979-5 and 2009/52718-7.

### References

- AVRAMEAS, A.; STROSBERG, A.D.; MORAILLON, A.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection based on synthetic peptides from Env glycoproteins. *Res. Virol.* v.144, n.3, p.209-218, 1993.
- BURKALA, E.; POSS, M. Evolution of feline immunodeficiency virus Gag proteins. *Virus genes*, v.35, n.2, p.251-264, 2007.
- CALZOLARI, M.; YOUNG, E.; COX, D.; DAVIS, D.; LUTZ, H. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.46, n. 1-2, p.83-92, 1995.
- CAXITO, F.A.; COELHO, F.M.; OLIVEIRA, M.E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun*, v.30, n. 8, p.953-956, 2006.
- CRAWFORD, P.C.; LEVY, J.K. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.37, n.2, p.335-350, 2007.
- de RONDE, A.; STAM, J.G.; BOERS, P.; LANGEDIJK, H.; MELOEN, R.; HESSELINK, W.; KELDERMANS, L.C.E.J.M., vanVLIET, A.; VERSCHOOR, E.J.; HORZINEK, M.C.; EGBERINK, H.F. Antibody response in cats to the envelope proteins of feline immunodeficiency virus: identification of an immunodominant neutralization domain. *Virol.*, v.198, p. 257-264, 1994.

- DUARTE, A.; TAVARES, L. Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.*, v.114, p.25-33, 2006.
- EGBERINK, H.F.; KELDERMANS, C.E.; KOOLEN, M.J.; HORZINEK, M.C. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am J Vet Res.*, v.53, n.7, p.1133-1138, 1992.
- EGBERINK, H.F.; LUTZ, H.; HORZINEK, M.C. Use of western blot and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, n.10, p.1339-1342, 1991.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-98, 1999.
- HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet. J.*, v.155, n.2, p.123-137, 1998.
- HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C.E.; VIDYASHANKAR, A.N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H.F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. *J. Feline Med. Surg.*, v.9, n.6, p.439-445, 2007.
- HARTMANN, K.; WERNER, R.M.; EGBERINK, H.; JARRETT, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet. Rec.*, v.149, n.11, p.317-320, 2001.
- HOHDATSU, T.; HIRABAYASHI, H.; MOTOKAWA, K.; KOYAMA, H. Comparative study of the cell tropism of feline immunodeficiency virus isolates of subtype A, B and D classified on the basis of the *env* gene V3-V5 sequence. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.93-100, 1996.

HOSIE, M.J.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, v.11, n.7, p.575-584, 2009.

ICTVdB MANAGEMENT. 00.061.1.06. Lentivirus. In: *ICTVdB – The Universal Virus Database*, version 4, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>. Acesso em: 20 maio 2009.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J.K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. *J. Virol.*, v.69, n.6, p.3639-3646, 1995.

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

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO JR, J.P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.11, p.467-470, 2007.

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO JR, J.P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Ciência Rural*, v.38, n.8, p.2245-2249, 2008.

LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.228, n.3, p.371-376, 2006.

MAHBOUDI, F.; IRINA, N.A.; CHEVALIER, A.; GHADIRI, A.; ADELI, A.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; BARKHORDARI, F.; FARZAMFAR, B.; ALINEJAD, M. A serological assay of human immunodeficiency virus type 1 antibodies based on

recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, v.125, n.2, p.295-303, 2006.

MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P.; SCHATZMAYR, H.G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R.M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Virol.*, v.82, n.16, p.7863-7874, 2008.

MERMER, B.; HILLMAN, P.; HARRIS, R.; KROGMANN, T.; TONELLI, Q.; PALIN, W.; ANDERSEN, P. A recombinant-based feline immunodeficiency virus antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.35, n.1-2, p.133-141, 1992.

NAKAMURA, K.; SUZUKI, Y.; IKEO, K.; IKEDA, Y.; SATO, E.; NGUYEN, N.T.; GOJOBORI, T.; MIKAMI, T.; MIYAZAWA, T. Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Arch. Virol.*, v.148, n.4, p.789-791, 2003.

PECORARO, M.R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M.E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, v.77, p. 2031-2035, 1996.

PEDERSEN, N.C.; BARLOUGH, J.E. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 199, n.10, p.1298-1305, 1991.

REID, G.; RIGBY, M.A.; MCDONALD, M.; HOSIE, M.J.; NEIL, J.C.; JARRETT, O. Immunodiagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant viral p17 and p24. *AIDS*, v.5, n.12, p.1477-1483, 1991.

ROSATI, S.; PROFITI, M.; LORENZETTI, R.; BANDECCHI, P.; MANNELLI, A.; ORTOFFI, M.; TOLARI, F.; CIABATTI, I.M. Development of recombinant capsid

antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis. *J. Virol. Methods*, v. 121, n.1, p.73-78, 2004.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. protoc.*, v.1, n.1, p16-22, 2006.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SPENCER, K.A.; OSORIO, F.A.; HISCOX, J.A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. *Vaccine*, v.25, n.30, p.5653-5659, 2007.

TEIXEIRA, B.M.; LOGAN, N.; CRUZ, J.C.M.; REIS, J.K.P.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; HAGIWARA, M.K.; WILLETT, B.J.; HOSIE, M.J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus., *Arch Virol.*, v.155, n.3, p.379-384, 2010.

