

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO COM
PROTEÍNA RECOMBINANTE DE NUCLEOCAPSÍDEO DO
CORONAVÍRUS FELINO (FCoV) PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ANTICORPOS EM SOROS DE GATOS NATURALMENTE
INFECTADOS

ARIANI CRISTINA DA SILVA ALMEIDA

BOTUCATU, SP
JUNHO, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO COM
PROTEÍNA RECOMBINANTE DE NUCLEOCAPSÍDEO DO
CORONAVÍRUS FELINO (FCoV) PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ANTICORPOS EM SOROS DE GATOS NATURALMENTE
INFECTADOS

ARIANI CRISTINA DA SILVA ALMEIDA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa
Araújo Junior.

BOTUCATU, SP
JUNHO, 2013

Nome do autor: Ariani Cristina da Silva Almeida.

Título: DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO COM PROTEÍNA RECOMBINANTE DE NUCLEOCAPSÍDEO DO CORONAVÍRUS FELINO (FCoV) PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS EM SOROS DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior
Presidente e Orientador
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBB – UNESP – BOTUCATU

Prof^a Dr^a Luciane Alarcão Dias Melicio
Membro
Departamento de Patologia
FMB – UNESP – BOTUCATU

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
UEL – LONDRINA

Data da defesa: 21 de Junho de 2013.

“Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, a minha avó e as minhas irmãs que são a razão do meu viver”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por estar presente em todos os momentos dos meus dias, da minha vida... Por toda a força concebida, pela qual pude superar todos os desafios e obstáculos, vencer todos os desatinos, e manter-me sempre esperançosa para que este momento se tornasse realidade. Foi através da fé e dessa força vinda do PAI que descobri que podemos conseguir tudo aquilo que sonhamos.

À minha MÃE, meu PAI e a minha querida AVÓ que são meus anjos da guarda, pessoas enviadas por Deus na minha vida, minha família mais do que abençoada, que são meus grandes espelhos de luta e dedicação... Pessoas a quem devo tudo, que sempre me amaram, me ajudaram e estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos da vida. Foram responsáveis por toda a minha educação sempre me ensinando a ser uma pessoa que faz o bem.

Às minhas irmãs ALESSA e ALINE que são meus amores, minhas amigas e meus anjos da guarda também, e que apesar da distância eu carrego comigo no meu coração todos os dias da minha vida.

Aos meus cunhados ANDRÉ e IZIDORO, por sempre estarem ao meu lado, e por serem irmãos que a vida me deu.

Ao meu orientador Prof. João Pessoa pela oportunidade que me concedeu, pela paciência, por todos os ensinamentos e compreensão diante das adversidades da vida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo 04677/2011).

As minhas amigas queridas Verônica, Paty Colavite e Paty Costa pela amizade sincera, parceria e companheirismo nos bons e maus momentos da vida.

Aos meus amigos de laboratório, que são pessoas que muito me ensinaram e contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. À Vanessa, Vivian, Claudia, Michely, Mariana, Thays, Jacqueline, Raissa, Ricardo e Duroc que estão e sempre estiveram dispostos a me ajudar. Ao pessoal que já foi embora em busca de novos horizontes e que muito me ajudaram no começo de tudo Flávio, Andressa, Lidyane, Sueli e Tays.

A pós-graduanda Aline Santana da Hora e seu orientador Prof. Paulo Eduardo Brandão, pela parceria e por ceder gentilmente às amostras de soros de gatos.

Aos meus amigos Dani, Solange, Sérgio, Berna, que apesar da distância estão sempre presentes na minha vida me apoiando, torcendo e rezando por mim.

Aos amigos que fiz na faculdade nestes quatro anos de Botucatu, Selene, João Marcelo, Marina, Acácia que sempre torceram pela minha vitória.

Aos funcionários e professores do departamento que sempre estiveram dispostos a ajudar, em especial ao Lula, Luis e Ana.

Ao meu tricolor, SPFC, que é uma grande paixão na minha vida.

A todos que me ajudaram direta e indiretamente.

E a todos os animais, em especial as minhas cadelas MEG e LILI... Razão pela qual me orgulho em ser MÉDICA VETERINÁRIA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Primers</i> desenhados para a amplificação da sequência codificante da proteína N do FCoV.....	12
------------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo da estrutura da espécie tipo dos coronavírus, o Murine hepatitis vírus (MHV), demonstrando as proteínas estruturais.....	03
Figura 2.	Esquema representativo das relações genéticas entre o FCoV e CCoV. As sequências azuis são de origem felina e as sequências laranja são de origem canina. As setas indicam os possíveis sítios de recombinações.....	04
Figura 3.	Mapa do vetor de expressão pGS21a. Na ponta da seta o local de inserção da sequência codificante da proteína N do FCoV entre os sítios de clonagem NcoI e BamHI.....	16
Figura 4.	PCR utilizando o kit LongRange 2 Step RT-PCR (QIAGEN®)....	25
Figura 5.	Gel de agarose a 1% - análise de restrição.....	26
Figura 6.	Análise das sequências – Alinhamento no programa Mega 5, mostrando a mudança do nucleotídeo.....	27
Figura 7.	Análise das sequências – Alinhamento no programa Mega 5, mostrando a mudança do aminoácido final.....	27
Figura 8.	Crescimento de 4 colônias da bactéria <i>E.coli</i> cepa BL21 (DE) com o plasmídeo pGS21a/proteína N do FCoV.....	27
Figura 9.	Digestão do plasmídeo pGS21a/proteína N com as enzimas NcoI e BamHI.....	28
Figura 10.	Análise das sequências 1, 3 e 4 no programa Mega 5.....	28
Figura 11.	Análise das sequências 1, 2 e 4 no programa Mega 5.....	29
Figura 12.	SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução.....	29
Figura 13.	SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução.....	30
Figura 14.	SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução.....	30
Figura 15.	SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução.....	31
Figura 16.	SDS-PAGE da determinação da solubilidade da proteína.....	32

Figura 17. SDS-PAGE após purificação, com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. Frações insolúveis 6, 5, 7 e 8 mostrando as bandas de tamanho esperado (aproximadamente 72 kDa).....	33
Figura 18. Frações insolúveis 14,16,19, 25, 28, 34 sem a presença da banda, e sobrenadante não purificado mostrando a banda de tamanho correspondente ao da proteína desejada (aproximadamente 72 kDa).....	33
Figura 19. SDS-PAGE após purificação, com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. Frações solúveis 4, 5, 6, 7 e 8 mostrando as bandas de tamanho esperado (aproximadamente 72 kDa).....	34
Figura 20. Western blot para confirmar a reatividade do antígeno recombinante.....	34
Figura 21. SDS-PAGE - gel corado com Coomassie blue após transferência de membrana.....	35
Figura 22. Gráfico da determinação da concentração ideal de antígeno proteína N/FCoV utilizando 50, 100, 150 e 200 ng/poço para a etapa de sensibilização.....	36
Figura 23. Gráfico da razão entre a média da duplicata do pool A ₄₅₀ maior que 1,5 e da média do pool A ₄₅₀ menor que 0,3.....	36
Figura 24. Gráfico da comparação de seis soros diferentes entre as frações de antígeno proteína N/FCoV solúvel e insolúvel.....	37
Figura 25. Gráfico da determinação da melhor diluição dos soros, testando as diluições 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400.....	37
Figura 26. Gráfico da Razão entre a média da duplicata do pool A ₄₅₀ maior que 1,5 e da média do pool A ₄₅₀ menor que 0,3 nas diluições 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400.....	38
Figura 27. Gráfico dos resultados obtidos no processamento de 382 amostras de soro de felinos, divididos em intervalos de A ₄₅₀ : 0,0 – 0,2; > 0,2 – 0,4; > 0,4 – 0,6; > 0,6 – 0,8; > 0,8.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorvância

BCA: ácido bicinconímico

bp: pares de bases

BSA: albumina sérica bovina

°C: grau Celsius

cDNA: DNA complementar

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxibonucleotídeos trifosfatados

E.coli: *Escherichia coli*

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FIVP: Feline infectious peritonitis vírus (vírus da peritonite infecciosa felina)

FCoV: Coronavírus felino

FECoV: Coronavírus entérico felino

g: grama

HCl: cloreto de hidrogênio

IgG: imunoglobulina G

IPTG: isopropil 1 β -tiogalactopiranosídeo

kb: kilobase

kDa: kilodalton

LB: Meio Luria-Bertani

LPD: leite em pó desnatado

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

NaCl: cloreto de sódio

N: nucleocapsídeo

nm: nanômetro

PIF: Peritonite Infecciosa Felina

PBS: tampão fosfato (phosphate buffer saline)

PBST: tampão fosfato (phosphate buffer saline) + 0,05% de tween 20

PCR: reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RT: transcriptase reversa

SDS: sódio dodecil-sulfato

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
(eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio)

TCB: tampão carbonato-bicarbonato

U: unidades

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo

μ L: microlitro

μ g: micrograma

μ M: micromolar

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

*“Tudo é do PAI, toda honra e toda glória, é dele a
vitória alcançada em minha vida”*

Banda Dom

SUMÁRIO

RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. Coronavírus felino.....	02
2.2. Epidemiologia.....	04
2.3. Patogenia.....	05
2.4. Sinais clínicos.....	06
2.5. Diagnóstico.....	06
2.5. 1. Diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV.....	07
2.5.2. Uso de ELISA no diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV.....	08
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Resumo das etapas experimentais.....	11
4.2. Desenho dos primers.....	12
4.3. Extração de RNA.....	12
4.4. Síntese de cDNA e Amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV com uso do kit QIAGEN® LongRange 2Step RT-PCR.....	12
4.5. Purificação dos fragmentos amplificados.....	13
4.6. Clonagem da região que codifica a proteína N do FCoV.....	13
4.7. Extração plasmidial.....	14
4.8. Digestão dos plasmídeos recombinantes.....	14
4.9. Sequenciamento.....	15
4.10. Aquisição de plasmídeo de expressão.....	15
4.11. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N.....	16
4.12. Digestão no vetor de expressão.....	17
4.13. Síntese de novos primers.....	17
4.14. Sequenciamento plasmídeo de expressão.....	17

4.15. Expressão da proteína recombinante.....	18
4.15.1. Determinação do tempo de incubação após a indução.....	18
4.15.2. Determinação da concentração de IPTG para a indução....	19
4.15.3. Determinação da solubilidade da proteína recombinante....	19
4.15.4. Produção da proteína recombinante.....	19
4.16. Purificação da proteína recombinante.....	20
4.17. Western blot.....	21
4.18. ELISA indireto.....	22
4.18.1. Amostras.....	22
4.18.2. Seleção do Pool A₄₅₀ maior que 1,5 e do Pool A₄₅₀ menor que 0,3.....	22
4.18.3. Teste do tipo de bloqueio da placa.....	22
4.18.4. Determinação da concentração do antígeno e Determinação da melhor fração a ser utilizada.....	23
4.18.5. Determinação da diluição dos soros.....	23
4.18.6. Aplicação do ELISA indireto e processamento das amostras.....	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Síntese de cDNA e Amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.....	25
5.2. Purificação, clonagem e digestão dos plasmídeos recombinantes..	25
5.3. Sequenciamento.....	26
5.4. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N.....	27
5.5. Digestão no vetor de expressão.....	28
5.6. Síntese de novos primers e Sequenciamento do plasmídeo de expressão.....	28
5.7. Expressão da proteína recombinante.....	29
5.7.1. Determinação do tempo de incubação após a indução e Determinação da concentração de IPTG para a indução.....	29
5.7.2. Determinação da solubilidade da proteína recombinante.....	31
5.7.3. Produção da proteína recombinante.....	32
5.8. Purificação da proteína recombinante.....	32
5.9. Western blot.....	34

5.10. ELISA indireto.....	35
5.10.1. Testes de padronização.....	35
5.11. Amostras processadas.....	38
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	52
9.1. Normas de publicação da revista “Veterinary Microbiology”.....	53
9.2. Artigo.....	62

ALMEIDA, A.C.S. **Desenvolvimento e aplicação do ELISA indireto com proteína recombinante de nucleocapsídeo do Coronavírus Felino (FCoV) para quantificação de anticorpos em soros de gatos naturalmente infectados**. Botucatu, 2013. 50 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Coronavírus felino (FCoV) é um membro da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus*, que é responsável por causar a peritonite infecciosa felina (PIF). Dentre os testes sorológicos utilizados no auxílio ao diagnóstico da doença, o método mais sensível e recomendado é o ELISA. O FCoV apresenta características que dificultam seu cultivo celular, sendo necessário o uso de antígenos recombinantes no ELISA. A proteína de nucleocapsídeo (N) do FCoV apresenta vantagens no seu uso como antígeno recombinante em testes sorológicos, por ser conservada, altamente imunogênica, e ser uma das mais produzidas durante a infecção viral. O objetivo deste trabalho foi padronizar e aplicar o ELISA indireto com uso de proteína N recombinante para detectar anticorpos anti-FCoV em soros de gatos naturalmente infectados. Um fragmento de rim de um felino que veio a óbito com PIF foi utilizado para extração de RNA viral, amplificação pela RT-PCR e sequenciamento da proteína N. A sequência da proteína N foi sintetizada com códons otimizados para expressão em *Escherichia coli* e inserida no plasmídeo pGS21a. Após sua produção, a proteína foi purificada. Foi realizado o Western blott com soro de gato naturalmente infectado para a confirmação da reatividade da proteína. Na padronização do ELISA indireto foi determinada o tipo de bloqueio, concentração de antígeno e diluição dos soros. Trezentos e oitenta e duas amostras de soros felinos foram testadas. Os resultados obtidos mostraram que a proteína produzida apresentou ótima reatividade no ELISA indireto. Foram encontradas diferenças de A_{450} entre os soros testados, onde se demonstrou uma alta capacidade de discriminação com A_{450} de 0,1 a 1,8, mostrando que o teste é quantitativo. O ELISA indireto padronizado para detecção de anticorpos anti-FCoV utilizando a proteína N recombinante é um método eficiente e pode ser aplicado em amostras de campo.

PALAVRAS-CHAVE: Coronavírus, Diagnóstico, ELISA, PIF, Felinos.

ALMEIDA, A.C.S. **Development and application of indirect ELISA with recombinant nucleocapsid protein of feline coronavirus (FCoV) for quantification of antibodies in sera from naturally infected cats.** Botucatu, 2013. 50 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The Feline Coronavirus (FCoV) is a member of the Nidovirales order, Coronaviridae family, Alphacoronavirus genus, which is responsible for causing Feline Infectious Peritonitis (FIP). Among the serological tests used in the disease diagnosis, ELISA is the most sensitive and recommended assay. FCoV has characteristics that difficult their cell culture growing, requiring the use of recombinant antigens in the ELISA. The FCoV nucleocapsid protein (N) is conserved, highly immunogenic and is the most protein produced during viral infection, being a great recombinant antigen in serological tests. The aim of this study was to standardize and apply the indirect ELISA using recombinant N protein to detect anti-FCoV antibodies in sera from naturally infected cats. A kidney fragment of died feline FIP positive was used for extraction of viral RNA, amplification by RT-PCR and sequencing of the protein N. The N protein sequence was synthesized with optimized codons for expression in *Escherichia coli* and inserted into pGS21a plasmid. The protein was produced, purified and the Western blotting was performed with sera from naturally infected cat to confirm the reactivity of the protein. To indirect ELISA standardization, the antigen concentration, serum dilution and the blocking reagent were determined. Three hundred eighty-two cat's sera were tested. The obtained results showed that the protein presented good reactivity in indirect ELISA. The A_{450} differences from 0.1 to 1.8 showed the quantitative feature of the assay. The standardized indirect ELISA for detection of anti-FCoV using recombinant N protein is efficient and can be applied in field samples.

KEY WORDS: Coronavirus, Diagnosis, ELISA, Feline, FIP.

1. INTRODUÇÃO

A peritonite infecciosa felina (PIF) é uma doença fatal, crônica, que acomete os felinos, causada por um Coronavírus, que muitos especialistas consideram uma mutação *in vivo* do coronavírus entérico felino (FECov), que está amplamente disseminado, principalmente em gatis e abrigos. O coronavírus felino (FCov) exibe uma patogenicidade bimodal, produzindo infecções entéricas subclínicas e a peritonite infecciosa felina, que é mortal para os gatos que a desenvolvem.

A PIF foi descoberta na década de 60 e, desde então, muitos estudos foram realizados na tentativa do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que possam diferenciar o felino que está apenas infectado do felino que desenvolverá a doença.

A patogenia da doença também tem sido alvo de muitas pesquisas, e a teoria mais aceita até os dias atuais é a da mutação interna, que ocorre ao acaso durante o curso da infecção entérica, na qual o vírus adquire capacidade de replicar-se em macrófagos, fato que possibilita a viremia e disseminação sistêmica.

O diagnóstico da PIF continua a ser um dos mais difíceis de se estabelecer com o animal em vida, e não existe nenhum método prático e rápido que confirme o diagnóstico. Dentre os métodos de auxílio ao diagnóstico que podem ser realizados estão os testes sorológicos.

Entretanto, no Brasil os testes sorológicos comercialmente disponíveis são importados e de elevado custo, sendo inviável, principalmente, para proprietários de gatis e abrigos. Embora os métodos sorológicos não determinem o diagnóstico conclusivo da doença, eles podem ser solicitados diante casos de felinos com sinais clínicos sugestivos da doença, com alterações em exames complementares (hemograma, perfil de proteínas), no monitoramento de animais que vivem sozinhos ou em ambientes populosos, como na introdução de um novo animal no ambiente.

Por isso, o desenvolvimento de uma técnica quantitativa para detecção de anticorpos anti-FCov é de grande importância, onde será possível oferecer um serviço de baixo custo, com qualidade e rapidez.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Coronavírus felino

O FCoV pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus*. São RNA vírus envelopados de fita simples, com polaridade positiva, que contêm o maior genoma de RNA conhecido, tornando-o altamente sujeito à mutação espontânea durante a replicação (Chandler *et al.*, 2006; Pratelli, 2008). É responsável por causar uma das mais importantes doenças infecciosas que acomete os felinos domésticos e selvagens, a peritonite infecciosa felina (PIF).

A PIF é uma doença infecciosa, imunomediada, sistêmica, progressiva e fatal (Addie & Jarrett, 2006). Foi descrita pela primeira vez na década de 60, no ano de 1963 no Angell Memorial Animal Hospital em Boston, pelo Dr. Jean Holzworth. Desde então, a doença tem sido relatada em todo o mundo (Pedersen, 2009; Le Poder, 2011).

Os coronavírus causam doenças respiratórias e entéricas prevalentes em humanos e animais domésticos (Lai & Homes, 2007).

Evidências postulam que o agente causal, vírus da peritonite infecciosa felina, seria um mutante do coronavírus entérico felino (FECoV), indistinguível deste último em relação às propriedades físicas e antigênicas. A mutação do FECoV ocorre ao acaso durante o curso da infecção entérica, na qual o vírus adquire a capacidade de replicar-se em macrófagos, fato que possibilita a viremia e disseminação sistêmica (Addie & Jarrett, 2006; Norsworthy *et al.*, 2006; Cornelissen *et al.*, 2007).

A estrutura genômica de todos os coronavírus é semelhante. O genoma dos FCoVs apresenta aproximadamente 29.000 nucleotídeos (Pedersen, 2009). Apresentam 11 ORFs (open reading frames), sendo duas grandes ORFs que codificam a polimerase, quatro ORFs que codificam as proteínas estruturais de espícula (S), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e envelope (E) (figura 1) e, cinco ORFs que codificam as proteínas não estruturais 3a, 3b, 3c, 7a e 7b (Addie *et al.*, 2004 – b; MYRRHA *et al.*, 2011).

A glicoproteína S é multifuncional e desempenha um papel central na biologia e patogênese da infecção por FCoV. São as responsáveis por dar a

esta família de vírus a aparência de coroa (microscopia eletrônica). São utilizadas para a ligação ao receptor e para a entrada viral, e apresentam as sequências mais variáveis no genoma do coronavírus (Woo et al, 2010).

A proteína M é a proteína estrutural mais abundante e apresenta funções importantes relacionadas com a ligação do vírus às células e com a imunidade do hospedeiro mediada por células, bem como a indução de anticorpos-dependentes (Pratelli, 2008; Woo et al., 2010).

A proteína N (50-60 KDa) também é uma das mais abundantes proteínas produzidas durante a infecção viral e desempenha um importante papel na replicação viral, montagem e na imunidade do hospedeiro, além de ser bastante conservada e altamente imunogênica. O seu uso para clonagem e produção de proteínas recombinantes em ensaios sorológicos é bastante comum (Lai & Homes, 2001; Batillani et al., 2010; Woo et al., 2010).

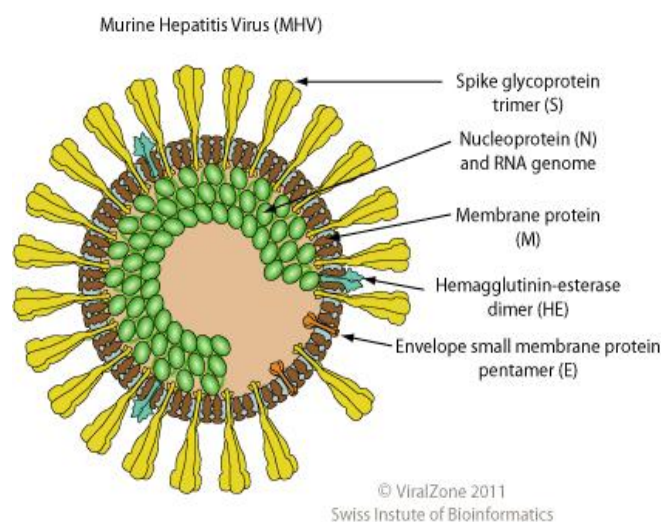


Figura 1. Esquema representativo da estrutura da espécie tipo dos coronavírus, o Virus da Hepatite Murina (MHV), demonstrando as proteínas estruturais. Fonte: ViralZone

O FECoV é classificado em dois sorotipos virais I e II, baseados nas suas características de crescimento nas culturas de células, citopatogenicidade e reatividade com anticorpos neutralizantes. O sorotipo I é observado particularmente em felinos e se replica pobremente em culturas de células, sendo o mais comum na natureza, responsável por 70% a 80% das infecções em felinos. O sorotipo II é resultante da recombinação entre o sorotipo I e o coronavírus canino, se replicando bem em culturas de células. Ambos os

sorotipos podem causar sinais clínicos nos gatos domésticos, que variam desde infecções assintomáticas, sinais entéricos ou de PIF (Addie & Jarrett, 2006; Chandler *et al.*, 2006; Shiba *et al.*, 2007; Pratelli *et al.*, 2009). Na figura 2 demonstra-se um esquema representativo das relações genéticas entre o FCoV e o CCoV (coronavírus canino), e os possíveis sítios de recombinação que dão origem ao sorotipo II do FCoV (Le Poder, 2011).

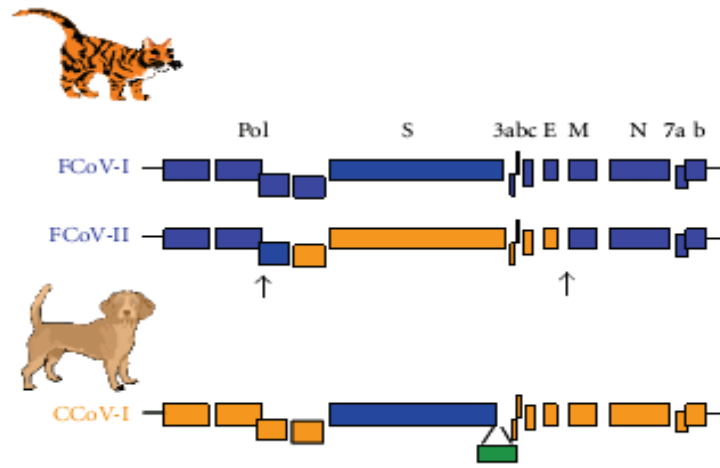


Figura 2. Esquema representativo das relações genéticas entre o FCoV e CCoV. As sequências azuis são de origem felina e as sequências laranja são de origem canina. As setas indicam os possíveis sítios de recombinações. Fonte: Le Poder, 2011.

2.2. Epidemiologia

A infecção por FCoV apresenta ampla distribuição nos felinos domésticos e também pode ser observada nos felinos selvagens. A PIF é mais frequente em ambientes com alta concentração de felinos, pois é onde ocorre maior infecção viral e aumento do número de disseminação de cepas do FIPV, expondo os animais a altas doses infectantes nas fezes (Hoskins & Loar, 1993; b- Foley *et al.*, 1997).

O FCoV é altamente contagioso, possuindo alta prevalência em gatis e abrigos de felinos. Ambos os sorotipos são transmitidos por via fecal-oral e geralmente causam infecções intestinais leves. O vírus persiste no intestino de gatos saudáveis e pode ser eliminado de forma contínua ou intermitente no ambiente, durante meses a anos (Norsworthy *et al.*, 2006). Segundo Hora *et*

al., 2013 o FIPV também pode ser eliminado nas fezes e na urina, podendo infectar diretamente outro felino.

Aproximadamente 13% dos gatos se tornam portadores do vírus para o resto da vida, mas raramente desenvolvem sinais clínicos de PIF. O vírus é mantido na população por intermédio dos carreadores crônicos e pela reinfecção de gatos portadores temporários, sendo a detecção desses portadores importante (Daiha, 2003).

A ocorrência da doença é maior em gatos jovens, com predomínio em animais entre seis meses e cinco anos de idade. No entanto, podem ocorrer casos em gatos com mais de 10 anos, associados ao declínio da resposta imune. Alguns fatores podem influenciar o aparecimento da PIF, dentre eles merecem destaque o estresse, “status” imunológico, uso de corticóides, histórico de cirurgias, a dose infectante e a virulência da cepa viral (Daiha, 2003; Oliveira et al., 2003).

2.3. Patogenia

A patogenia da doença é complexa, e até os dias atuais ela permanece incerta, e algumas hipóteses são sugeridas: a teoria da mutação interna e a teoria de que fatores do hospedeiro e fatores virais influenciariam esta mutação (Myrrha et al., 2011).

O gato infecta-se com o FCoV por via oronasal. O vírus atinge o intestino onde se replica no citoplasma dos enterócitos maduros do topo das vilosidades intestinais, causando infecção assintomática ou diarreia, consequente à morte dessas células (Addie & Jarrett, 2006; Pedersen, 2009).

Na teoria da mutação interna o FCoV que está nos enterócitos apresenta capacidade de se replicar em macrófagos, invadir os tecidos intestinais e o sangue, e a sua presença no sangue e nos tecidos levaria a replicação continua, propiciando o surgimento de cepas mutantes com virulência aumentada (Vennema et al., 1998).

Na outra teoria proposta o surgimento de quasispecies e a resposta imune dos felinos, seriam os fatores virais e do hospedeiro, respectivamente, envolvidos na mutação (Myrrha et al., 2011). Os gatos que apresentam uma forte resposta imune mediada por células não desenvolvem a PIF, entretanto,

gatos que montam predominantemente uma resposta humoral progridem para a doença. Acredita-se que o desenvolvimento da doença seja fortemente dependente de resposta mediada por células T, que provavelmente é a única resposta imune eficiente contra a progressão da doença (Pedersen, 1987; Venemba et al., 1995; Satoh et al., 2011). O mecanismo de depleção das células T não é claro, porque o vírus não infecta linfócitos, somente macrófagos e monócitos (Sykes, 2010).

2.4. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos que ocorrem na PIF são provenientes diretamente da vasculite e do dano isquêmico causado nos órgãos em decorrência das lesões nos vasos que os irrigam. A PIF é classificada em duas formas: uma efusiva (úmida), caracterizada por vasculite e poliserosite (que ocasiona efusões torácicas e abdominais), e uma forma não efusiva (seca), caracterizada por lesões piogranulosas em órgãos (Kipar *et al.*, 2005).

Os gatos que apresentam sinais clínicos evidentes de PIF provavelmente não sobreviverão por mais de 12 meses, pois não há tratamento efetivo e o curso da doença resulta em óbito do animal (Hartmann, 2005).

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico antemortem da PIF é desafiador, pois não existe disponível um teste que seja sensível e específico para o FIPV. Como o vírus é altamente prevalente nas populações felinas, a maioria dos gatos são positivos para FCoV nos testes sorológicos e de amplificação de DNA com o uso da enzima transcriptase reversa (RT-PCR) (Can-Sahna *et al.*, 2007). Um diagnóstico conclusivo não pode basear-se exclusivamente na sorologia ou na RT-PCR, que detectam a resposta humoral ou a presença do vírus. Assim, vão fornecer informações sobre a infecção, e não sobre uma possível evolução para o desenvolvimento da PIF (Giori et al., 2011).

Essas observações sustentam a hipótese de que a presença do FCoV ou de anticorpos na corrente sanguínea não é um marcador diagnóstico para a PIF, mas sim de que o estado de portador existe, e os gatos sistemicamente

infectados permanecem saudáveis e representam uma fonte constante de disseminação do FCoV (a- Foley *et al.*, 1997).

As dificuldades em diagnosticar de forma definitiva a PIF são decorrentes da variabilidade das manifestações clínicas (sinais são inespecíficos), do período de incubação, da ausência de alterações hematológicas e bioquímicas patognomônicas, e da baixa sensibilidade e especificidade dos testes utilizados rotineiramente (Hartmann *et al.*, 2003).

Em muitos casos, o diagnóstico presuntivo pode ser feito através da avaliação do histórico, achados clínicos, resultados laboratoriais (hemograma, bioquímicos, avaliação da efusão), título de anticorpos para coronavírus e exclusão de doenças semelhantes. O diagnóstico definitivo é feito através da necropsia e histopatologia (Oliveira *et al.*, 2003; Addie & Jarrett, 2006).

2.5. 1. Diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV

A infecção pelo FCoV é extremamente comum em gatos domésticos e já foi demonstrada por inúmeros estudos de soroprevalência (Addie & Jarret, 2006). Anticorpos estão presentes em cerca de 80 a 90% dos gatos que vivem em gatis, e apenas 5 a 10% desses gatos soropositivos desenvolverão a doença e morrerão de PIF (Herrewegh *et al.*, 1995).

A detecção de anticorpos anti-FCoV quando realizada de uma maneira correta e interpretada dentro de um contexto ideal contribui como uma importante ferramenta de auxílio (Addie & Jarrett, 2006; Mota, 2010). E através da sorologia é possível o monitoramento de níveis de anticorpos de felinos que vivem em ambientes populosos, sendo possível a separação de animais positivos; o monitoramento de felinos que são usados para reprodução. A sorologia também pode ser importante para o acompanhamento de surtos em gatis e, principalmente, para o monitoramento desses gatis até que eles se tornem livres da infecção pelo FCoV (Zanutto & Mitika, 2007).

Os testes utilizados devem ser quantitativos, pois um teste sorológico que apenas indique a presença de anticorpos não é útil no diagnóstico (Hartmann, 2005). Dentre os testes que são realizados, estão a imunofluorescência indireta, a técnica de neutralização viral e a prova de imunoadsorção enzimática (ELISA) (Pedersen, 2009).

2.5.2. Uso de ELISA no diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV

Pratelli (2008) considera o método ELISA o mais sensível podendo ser usado como teste padrão para detectar anticorpos anti-FCoV. O autor realizou um estudo onde a sensibilidade e especificidade da técnica foi avaliada em comparação aos testes de vírus neutralização e imunofluorescência indireta (considerados como testes padrão). O ELISA demonstrou ter uma boa especificidade e sensibilidade para detectar anticorpos anti-FCoV. Na análise dos resultados o autor considerou que o ELISA foi capaz de detectar anticorpos contra ambos os sorotipos do FCoV, podendo ser utilizado como teste padrão para a triagem de soros de gatos.

Segundo Addie *et al* (2004 - a) um teste utilizado para detecção de anticorpos anti-FCoV através da técnica de ELISA, comercialmente disponível (FCoV Immunocomb, Biogal Galed Laboratories) foi comparado com a técnica de imunofluorescência indireta, e apresentou uma sensibilidade de 95% e a especificidade de 83%, sendo considerado um teste útil diante um caso de suspeita de PIF.

Os Coronavírus apresentam dificuldade de crescimento em cultivo de células, e o uso de antígenos recombinantes é bastante comum, pois são mais práticos de se obter, possibilitando a produção de grande quantidade de proteína e utilizando métodos que facilitam a sua purificação.

A proteína N pelas características citadas na revisão acima é a mais utilizada como antígeno recombinante em técnicas sorológicas, e já foi demonstrado o seu uso com sucesso no diagnóstico sorológico para coronavírus de outras espécies, destacando a SARS (síndrome respiratória aguda grave) (Timani *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2004; Carattoli *et al.*, 2005).

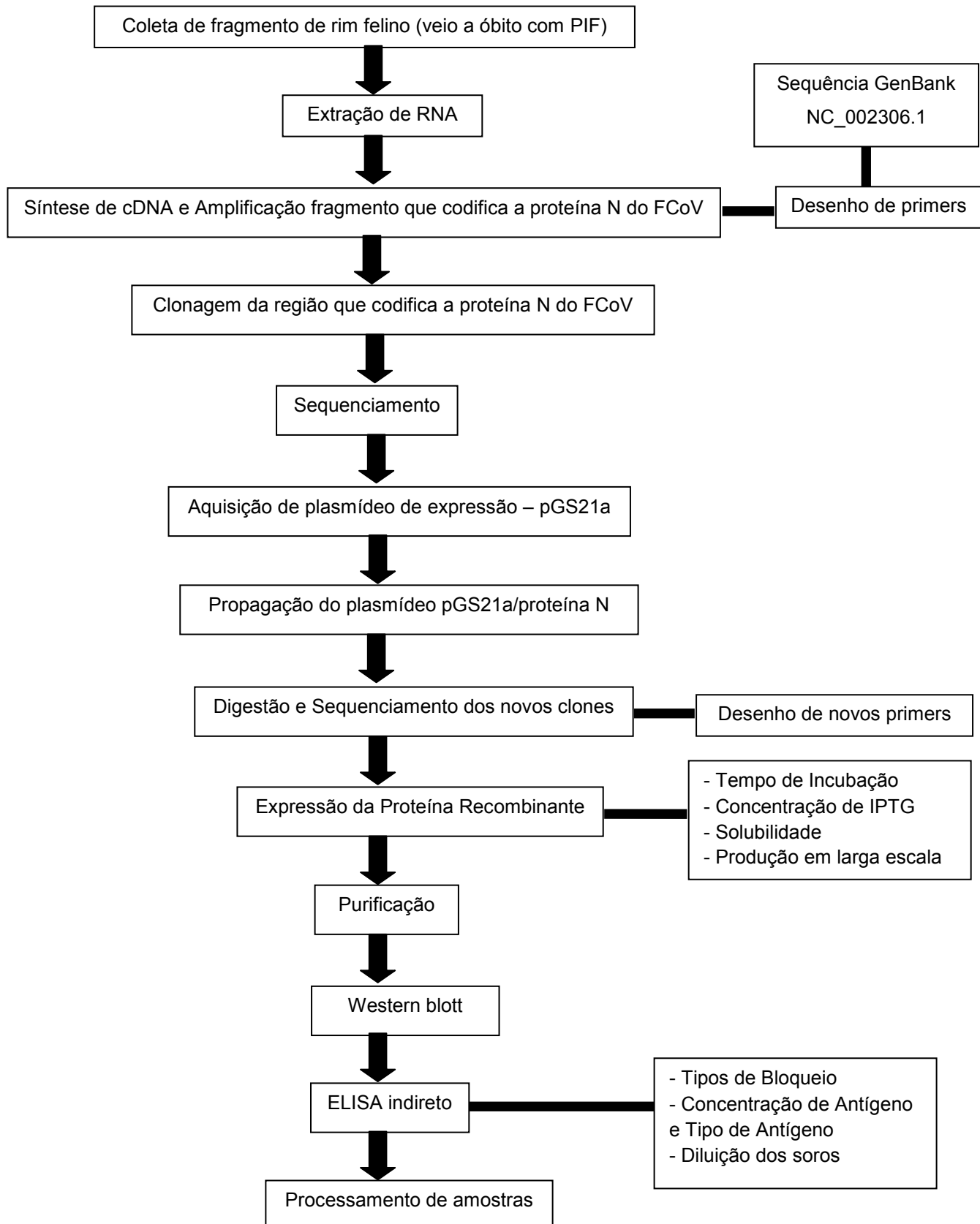
Até onde sabemos não há nenhum teste com uso de proteína recombinante para detecção de anticorpos anti-FCoV de baixo custo, como relatado na revisão acima. Diante das vantagens apresentadas tivemos como objetivo geral a padronização de um ELISA indireto que possa oferecer um serviço de qualidade, rápido e de baixo custo.

3. OBJETIVOS

- Produzir o antígeno recombinante proteína de nucleocapsídeo (N) do FCoV para detecção de anticorpos anti-FCoV.
- Padronizar o método de ELISA indireto para quantificação de anticorpos anti-FCoV em soros de gatos naturalmente infectados.
- Aplicar a técnica já padronizada em amostras de campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Resumo das etapas experimentais



4.2. Desenho de primers

Com o acesso NC_002306.1 (GenBank) primers para a proteína N do FCoV foram desenhados utilizando a ferramenta do Primer Blast. Os primers descritos na tabela 1 - 1 e 2 – amplificam toda a proteína N (incluindo o códon iniciador e o códon terminador) totalizando 1413 pb, e os primers 3 e 4 uma parte interna da proteína totalizando 476 pb.

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho	Nº acesso
Forward primer 1	GCAACTACTGCCACAGGATGGGC	1413 pb	NC_002306.3
Reverse primer 2	CGCAGACTACTGTCAGGCACACC		
Forward nested 3	TGGGTTGCAAGGGATGGTGCC	476 pb	NC_002306.3
Reverse nested 4	TGAGGGTAGCATTTGGCAGCG		

Tabela 1: Primers desenhados e utilizados na amplificação da proteína N do FCoV.

4.3. Extração de RNA

O RNA viral foi extraído a partir de fragmento de rim de um felino que veio a óbito com PIF, utilizando o TRIZOL (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante.

4.4. Síntese de cDNA e Amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV com uso do kit QIAGEN® LongRange 2Step RT-PCR

Na primeira etapa, o RNA foi desnaturado com uma incubação de 65°C por 5 minutos, e após colocado no gelo. Em um tubo foi preparado o master mix (LongRange RT Buffer 5x; dNTP mix (10 mM/cada); Oligo dT (1 mM); LongRange RNase inhibitor (4U/μL); LongRange RT e água nuclease free), preparado para reação final de 20 μL, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA desnaturado foi colocado junto com esse master mix, homogeneizado e incubados a 42°C por 90 minutos, e em seguida a 85°C por 5 minutos para inativação da enzima. Este cDNA foi armazenado a -20°C até o momento do seu uso.

Na segunda etapa de amplificação um novo master mix foi preparado (LongRange PCR Buffer com $MgCl_2^{2+}$; dNTP mix (10 mM/cada); primer sense 1 e anti-sense 2 (tabela 1) - (0,4 μ M/cada); LongRange PCR enzyme mix (2U) e água nuclease free. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 93°C por 3 minutos, seguida de 10 ciclos de 93°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e meio para extensão das fitas. Em seguida 28 ciclos de 93°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos e meio + 20 segundos para extensão das fitas, e 68°C por 10 minutos para a etapa de extensão final.

Após a PCR, o produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®), e após a visualização da banda do produto de interesse (aproximadamente 1500 pb) a mesma foi cortada para etapas posteriores.

4.5. Purificação dos fragmentos amplificados

O fragmento que codifica a proteína N do FCoV que apresentou o tamanho esperado foi cortado do gel de agarose a 1% e purificado com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®) seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente quantificadas em gel de agarose a 1% em comparação ao High DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

4.6. Clonagem da região que codifica a proteína N do FCoV

O DNA purificado foi clonado no plasmídeo pGEM-T- Easy (Promega®) seguindo as recomendações do fabricante. Esse plasmídeo foi utilizado na transformação físico-química feita em bactérias *E. coli* cepa DH5 α . Na clonagem foi utilizada a proporção 3:1 cópias do produto de PCR/vetor para a realização da ligação. As bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar (1% tripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% de ágar bacteriológico) (SAMBROOK et al., 1989) contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 100 μ L de IPTG (isopropil1 β -tiogalactopiranosídeo – 100 mmol/L) e 20 μ L de X-gal (5-bromo-4-

cloro-3-indolil β -D-galactopiranosídeo – 50 mg/mL) aplicados na sua superfície. As placas foram incubadas por 16 a 18 horas a 37°C.

Uma colônia branca foi visualizada e uma PCR desta foi feita utilizando os *primers* do vetor descritos pelo fabricante (pGEM-TF 5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3' posição 2949-2972 e pGEM-TR 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' posição 176-197).

Para a realização da PCR foi utilizado o kit Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de lise das bactérias e desnaturação a 94 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação da fita de DNA, 51°C por 1 minuto para o anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos e meio para a extensão das fitas, e a fase de extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®).

A colônia foi inoculada em caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina. A cultura foi mantida sob agitação constante de 220 rpm, a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

4.7. Extração plasmidial

Na cultura após o crescimento de 16 horas, os plasmídeos foram extraídos com o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel®), seguindo recomendações do fabricante. A quantificação dos plasmídeos recombinantes extraídos foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Uma fração de 900 µL dessa cultura foi congelada a -80 °C com 10% de glicerol.

4.8. Digestão dos plasmídeos recombinantes

Para confirmar a inserção dos fragmentos desejados, foi feita digestão dos plasmídeos recombinantes extraídos com a enzima EcoRI (Fermentas®), que libera o fragmento inserido no vetor pGEM Easy (Promega®). Foi utilizada 10 U da enzima para digerir 1µL do plasmídeo. A reação foi incubada por 2

horas a 37°C e os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1% corado com SYBR[®] Safe DNA gel Stain (Invitrogen[®]).

4.9. Sequenciamento

Os clones que apresentaram o fragmento de tamanho desejado (plasmídeo+inserto) tiveram suas bandas cortadas, e posteriormente purificadas com o kit illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare[®]). Esses fragmentos purificados foram submetidos ao sequenciamento. Para tanto foi utilizado o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de seqüenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante, e utilizando os primers sense ou antisense do vetor pGEM.

Uma fração do produto purificado da PCR foi enviada também para o sequenciamento, para uma comparação com a amostra que passou pelo processo de clonagem. Após esses resultados, para confirmar a possível mutação encontrada uma segunda clonagem foi realizada, onde a mesma amostra inicial foi utilizada e os mesmos protocolos foram repetidos.

4.10. Aquisição de plasmídeo de expressão

Com a sequencia da proteína N do FCoV, após sua análise no programa MEGA 5, em comparação com outras sequencias já depositadas no GENBANK, foram avaliadas as melhores condições para otimização e solicitada a síntese do gene completo, contendo 1139 pb no vetor pUC 57, e a subclonagem em vetor de expressão pGS21a para a empresa GenScript (representante no Brasil – FASTBIO). O fragmento desejado foi solicitado entre os sítios de clonagem NcoI e Bam HI, com a cauda de histidina na porção amino-terminal (figura 3).

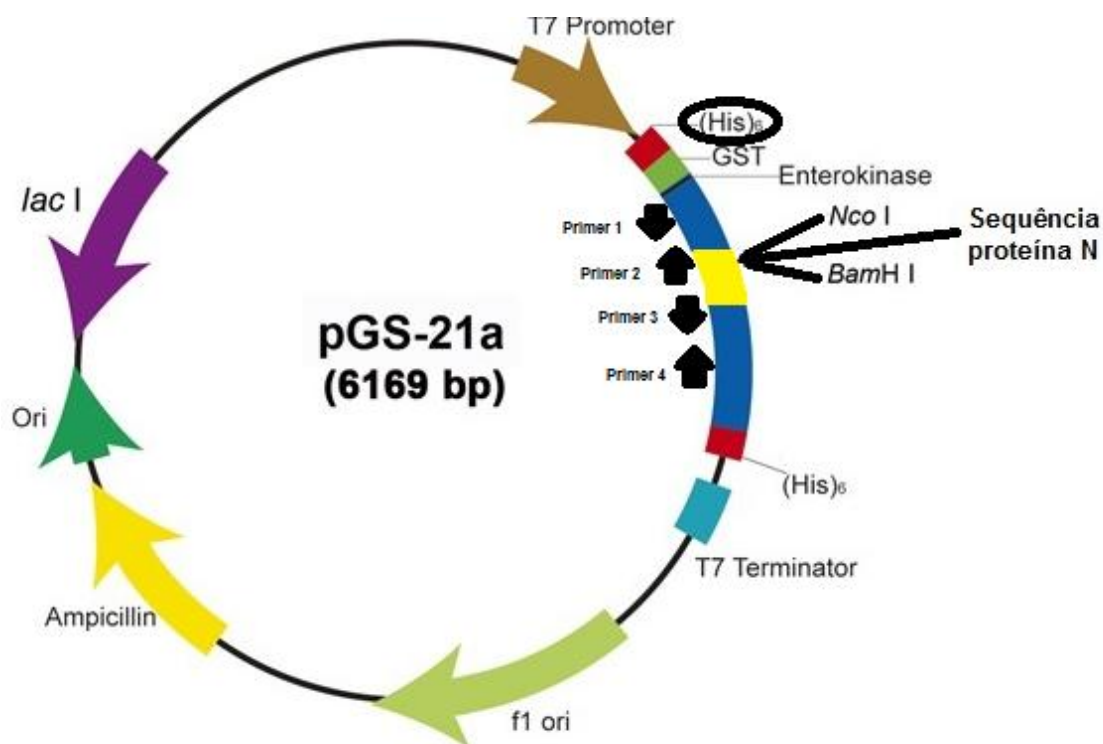


Figura 3. Mapa do vetor de expressão pGS21a. Na ponta da seta o local de inserção da sequência codificante da proteína N do FCoV entre os sítios de clonagem NcoI e BamHI.

4.11. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N

O plasmídeo de expressão contendo a sequência otimizada da proteína N foi inserido na bactéria *E.coli* cepa DH5- α através da transformação físico-química, seguindo orientações do fabricante, e após foi realizada extração plasmidial com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Em seguida o DNA plasmídial extraído acima foi introduzido na bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE) também através da transformação físico-química, seguindo orientações do fabricante. Duas colônias isoladas foram submetidas à multiplicação em meio LB contendo 100 μ g/mL de Ampicilina, submetidos à agitação de 220 rpm a 37°C overnight. A extração plasmidial novamente foi realizada com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), e a quantificação feita no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Ao final de cada etapa uma fração de 900 μ L da cultura com 10% de glicerol foi armazenada a -70°C para posterior uso se necessário.

4.12. Digestão no vetor de expressão

Uma análise de restrição foi realizada na tentativa de confirmar o tamanho do fragmento desejado. Foram feitas análises para a melhor escolha do tampão a ser usado (Tango 1x), e as enzimas utilizadas foram NcoI (New England Biolabs®) e BamHI (Fermentas®), pois a sequência se encontrava inserida entre estas duas enzimas no plasmídeo pGS21a (sítio de clonagem). A reação foi realizada com incubação a 37°C, por 2 horas, seguindo as recomendações do fabricante. Após a reação, os produtos digeridos foram analisados em gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®).

4.13. Síntese de novos primers

Para a realização das reações de sequenciamento, foi necessária a síntese de quatro novos primers, que foram desenhados no programa *Primer Blast*, utilizando a sequência otimizada pela empresa GenScript, para a confirmação da presença da sequência codificante da proteína N do FCoV.

O primer FCoV 1 anela com a terminação 5' da região do plasmídeo próxima a enterokinase (5' GAT CTG GTA CCG ACG ACG AC 3'), enquanto o primer FCoV 2 anela com a terminação 3' da região interna da proteína N (3' GTT AGA TTG CTG GCG CAC AC 5') amplificando um produto de 633 pares de bases. O primer FCoV 3 anela com a terminação 5' da região interna da proteína N (5' AAA CGC GTG ATA CCG CAC CG 3'), enquanto o primer FCoV 4 anela com a terminação 3' da região do plasmídeo próxima a histidina carboxi-terminal (3' TCA GCT TCC TTT CGG GCT TT 5') amplificando um produto de 580 pares de bases. A localização do anelamento dos primers pode ser observada na figura 3.

4.14. Sequenciamento plasmídeo de expressão

A colônia que obteve a maior quantificação no mini-prep foi submetida ao sequenciamento para confirmar a presença da sequência inserida, a orientação correta do fragmento e verificar a fase de leitura de tradução da proteína a ser

produzida. Para tanto foi utilizado o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme recomendação do fabricante e utilizando um dos primers descritos no item 4.13.

4.15. Expressão da proteína recombinante

4.15.1. Determinação do tempo de incubação após a indução

Uma colônia isolada do pGS21a/proteína N em *E.coli* cepa BL21 (DE) foi usada para inocular 5 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina, que foram incubadas a 37°C, por 16 a 18 horas, sob agitação suave de 200 rpm. Como controle foi usado uma colônia de *E.coli* cepa BL21 (DE) sem plasmídeo, deixada sob as mesmas condições citadas acima; não foi possível fazer o controle do plasmídeo, pois não tínhamos o pGS21a sem inserto.

Uma fração de 1 mL de cada cultura foi transferida para 20 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina (a cultura controle só com a bactéria sem plasmídeo foi inoculada em meio sem antibiótico). Essas culturas foram incubadas a 37°C, a 200 rpm até atingir a A_{600} de 0,5-1,0.

Atingida a A_{600} desejada, essa nova cultura foi dividida em duas, sendo uma induzida e a outra não induzida. A indução foi realizada com IPTG nas concentrações finais de 0,1 mmol/L; 0,5 mmol/L e 1,0 mmol/L, incubadas a 30°C, a 200 rpm.

Para a determinação do tempo de incubação onde ocorreu a maior produção de proteína, foram coletadas frações de 1 mL nos momentos 0, 30 minutos, 1, 2, 3 e 16 horas (deixadas overnight). A cada momento foi realizada a leitura da A_{600} e a fração de 1 mL de cada cultura foi centrifugada (16.000xg, 2 minutos) 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; 2,88 mmol/L 2-Mercaptoetanol e 0,02% Azul de Bromofenol), aquecido a 100°C por 5 minutos, e depois mantido no gelo.

4.15.2. Determinação da concentração de IPTG para a indução

Para determinar a concentração ótima de IPTG para a indução da proteína recombinante, o mesmo procedimento do item 4.15.1 foi realizado. A cultura de *E.coli* cepa BL21 (DE) com pGS-21a/proteína N foi induzida com IPTG nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mmol/L.

4.15.3. Determinação da solubilidade da proteína recombinante

A cultura da *E.coli* cepa BL21 (DE) com pGS-21a/proteína N induzida com IPTG a 0,5 mmol/L e incubada durante 3 horas (previamente determinados) a 30°C, foi submetida a lise para determinar se a proteína N recombinante se encontrava na fração solúvel ou na fração insolúvel.

Para isso, as células bacterianas foram centrifugadas a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C, lavadas 2 vezes em PBS, e ressuspensas em tampão de lise (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4; 0,5 mol/L NaCl, 0,5 mg/mL lisosima) a 1/10 do volume inicial da cultura, e foi adicionado nessa fase inibidores de proteases (Protease Inhibitor Mix HP - SERVA Electrophoresis) na concentração recomendada pelo fabricante.

O lisado foi incubado por 30 minutos a 4°C, e após submetido a agitação suave de 100 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado Triton-X na concentração final de 1% e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação suave de 100 rpm. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C. A fração solúvel (sobrenadante) foi separada, e o pellet (fração insolúvel) foi ressuspendido em 20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4; 0,5 mol/L NaCl e 8 mol/L de uréia.

4.15.4. Produção da proteína recombinante

Uma colônia isolada do pGS-21a/proteína N em *E.coli* cepa BL21 (DE) foi usada para inocular 15 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de Ampicilina, incubadas por 16 a 18 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm.

Uma fração de 8 mL dessa cultura foi transferida para 150 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de Ampicilina, e deixada sob agitação a 200 rpm a 37°C

até atingirem A_{600} de 0,5-1,0. Após, a cultura foi induzida com IPTG na concentração de 0,5 mmol/L por 16 horas (previamente determinados) e incubada a 30°C, a 200 rpm.

Toda a cultura foi centrifugada a 3000x g, durante 15 minutos, a 4°C. O meio foi descartado e o pellet foi lavado 2 vezes em PBS (10 a 15 mL por vez, centrifugado a 3000x g, por 15 minutos, a 4°C). As células bacterianas foram então ressuspensas em Tampão de Lise (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4; 0,5 mol/L de NaCl, 1 mg/mL de lisozima e 20 mmol/L de Imidazol) a 1/10 do volume da cultura, juntamente com Protease Inhibitor Mix HP (SERVA Electrophoresis) na concentração recomendada pelo fabricante.

Em seguida as culturas foram incubadas no gelo por 15 minutos e submetida a lise por sonicação por 6 vezes (amplitude de 40%, 4°C por 30 segundos, e intervalo de 1 minuto).

Foi realizada a centrifugação a 3000x g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e o pellet (fração insolúvel) ressuspensionado em solução desnaturante (20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4; 0,5 mol/L de NaCl, 20 mmol/L de imidazol e 8 M de ureia) a 1/10 do volume da cultura.

Ao final das etapas 4.15.1 a 4.15.4 a análise das frações foi realizada pela SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie Blue.

4.16. Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína recombinante presente na fração solúvel e insolúvel foi realizada com a coluna His TrapTM 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 amino ou carboxi-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 de fosfato de sódio pH 7,4; 0,5 mol/L de NaCl; 20 mmol/L de imidazol), com auxílio em todas as etapas da bomba peristáltica. Para eluição da proteína recombinante foi utilizada a concentração de 500 mmol/L de Imidazol em tampão fosfato (20

mmol/L de fosfato sódio pH 7,4 e 0,5 mol/L de NaCl), onde todas as frações eluídas foram coletadas em 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 proteína.

Algumas frações foram selecionadas (fração insolúvel: 5, 6, 7 e 8; fração solúvel: 4, 5, 6, 7 e 8) e analisadas pela SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com gel de separação de 12,5% e coloração com Coomassie Blue.

Após determinar as frações que possuíam a proteína recombinante, a concentração de proteína 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 foi adicionado inibidores de proteases (Protease Inhibitor Mix HP – SERVA Electropheris).

4.17. Western blot

As frações foram submetidas ao Western Blot para verificação da reatividade com o antígeno produzido. Foi realizada a SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e após a transferência em membrana de nitrocelulose (porosidade 0,22 µm - ProtranTM – Whatman) no aparelho Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio Rad®), seguindo recomendações do fabricante. A transferência foi realizada a 12 V, por 20 minutos, e como tampão de transferência foi usado o Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% metanol, 3,35 mL de SDS a 10%, pH 9.2).

Após a transferência, a membrana foi corada em solução de Ponceau S (0,1% Ponceau e 5% Ácido acético glacial) por 10 minutos e descorada com água Mili-Q até a total eliminação da coloração avermelhada presente na membrana. O gel foi corado também com a coloração de Coomassie Blue para verificação da eficiência da transferência.

As etapas seguintes foram realizadas através do uso do kit Immun-Blot Assay Kit (Bio Rad®) seguindo as recomendações do fabricante. Como anticorpo primário foi utilizado um pool de cinco soros de felinos escolhidos aleatoriamente, e como anticorpo secundário o conjugado anti IgG de coelho Anti-IgG de gato marcado com peroxidase.

4.18. Elisa Indireto

4.18.1. Amostras

Foram coletadas amostras biológicas de felinos residentes em gatis (abrigos) nos municípios de São Paulo e Rio de Janeiro, com os quais se firmou colaboração para a realização deste projeto, em parceria com a Doutoranda Aline Santana da Hora, orientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) através do processo FAPESP bolsa 09/17535-9; auxílio a pesquisa 2010/07492-8.

Os gatis foram selecionados pelo histórico de ocorrência de PIF em pelo menos um animal do gatil. De todos os animais cohabitantes foram coletadas amostras. Para o estudo foram utilizadas as amostras de soro obtidas em pelo menos quatro momentos, com intervalos de quatro meses entre as coletas.

4.18.2. Seleção do Pool A_{450} maior que 1,5 e do Pool A_{450} menor que 0,3

Para a seleção dos cinco soros que fariam parte dos pools com A_{450} maior que 1,5 e A_{450} menor que 0,3 noventa amostras aleatórias foram testadas nas seguintes condições: sensibilização com 200 ng/poço, bloqueio com LPD a 10%, soros diluídos 1/100. A partir dos resultados, cinco soros de gatos para cada pool foi selecionado.

4.18.3. Teste do tipo de bloqueio da placa

Na tentativa de diminuir as reações inespecíficas da reação foram testados como bloqueio o leite em pó desnatado (LPD) a 10% e o soro albumina bovina (BSA) a 2%, diluídos em TCB pH 9,6 e incubados a 37°C em câmara úmida por 1 hora, 1 hora e meia ou por 2 horas.

4.18.4. Determinação da concentração do antígeno e Determinação da melhor fração a ser utilizada

Na determinação da concentração ideal de antígeno a ser utilizado na reação foram testadas as concentrações de 50, 100, 150 ou 200 ng/poço de antígeno recombinante proteína N do FCoV. Testes com as frações dos antígenos solúveis e insolúveis também foram realizados nas mesmas condições para a escolha do melhor a ser utilizado.

Para calcular qual a melhor concentração e qual o melhor tipo de antígeno a ser usado, foi calculada uma razão entre a absorvância média da duplicata do pool maior que 1,5 e a absorvância média do pool menor que 0,3. Aquele que apresentou maior razão foi escolhido para as análises seguintes.

4.18.5. Determinação da diluição dos soros

Na determinação da melhor diluição de soro a ser utilizada, foram testadas as diluições 1/50, 1/100, 1/200 ou 1/400 com as concentrações de antígeno testadas no item 4.18.4. As análises foram feitas conforme descritas no item acima.

4.18.6. Aplicação do ELISA indireto e processamento das amostras

As amostras foram processadas em microplacas de ELISA de fundo plano e rígido (Nunc - Maxisorp[®]) com 96 cavidades. A sensibilização foi feita com 100 µL/poço do antígeno diluído em TCB pH 9,6 na concentração de 200 ng/poço, durante 16 a 17 horas, a 4 °C em câmara úmida para a adsorção. As amostras foram testadas todas em duplicata. Com o término da incubação, a placa era lavada cinco vezes com PBST pH 7,4. Estas lavagens ocorreram entre todas as etapas seguintes.

Para a fase de bloqueio foi utilizado o BSA a 2% diluído em TCB pH 9,6 sendo aplicado 300 µL/poço durante 1 hora em câmara úmida a 37°C. Os soros dos gatos foram diluídos 1/200 com PBST e BSA a 2% sendo aplicado 100 µL/poço e incubado durante 1 hora em câmara úmida a 37°C.

O conjugado IgG de coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase foi

diluído 1/1000 em PBST e BSA a 2% e incubado durante 1 hora em câmara úmida a 37°C. Na etapa seguinte foi adicionada a cada cavidade 100 µL/poço da solução de substrato cromógeno, contendo 10 mL de tampão citrato/acetato (pH 6,0), 100 µL de TMB (10 mg/mL diluído em DMSO) e 2,5 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 15 minutos de incubação sob agitação suave em temperatura ambiente, a reação enzimática foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de HCl a 2mol/L. A leitura das microplacas foi realizada em um leitor de ELISA (Multiskan EX – Labsystems) a um comprimento de onda de 450 nm. Dos resultados foi subtraído um branco onde foram adicionadas as etapas de bloqueio e substrato. No total 382 amostras foram processadas.

5. RESULTADOS

5.1. Síntese de cDNA e Amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV

Na figura 4 pode-se observar, entre os tamanhos do marcador 2000 e 1000 pb, um fragmento único condizente com o tamanho esperado de aproximadamente 1413 pb.

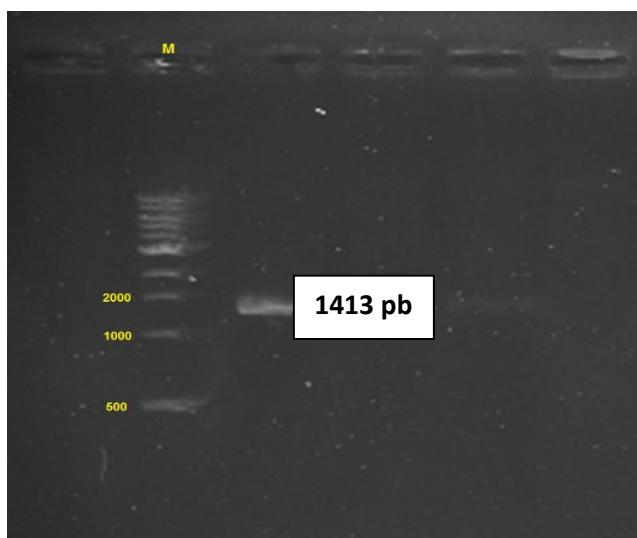


Figura 4. PCR utilizando o kit LongRange 2 Step RT-PCR (QIAGEN®) amplificando um produto de 1413 pb (primers 1-2). * O marcador utilizado (M) foi de 1 kb.

5.2. Purificação, clonagem e digestão dos plasmídeos recombinantes

Após a purificação obteve-se uma concentração final de 10 ng/ μ L do DNA proteína N/FCoV. Apenas uma colônia branca foi visualizada na placa. O resultado da PCR da colônia para confirmar a inserção do fragmento no plasmídeo foi negativa (mudanças nas etapas da PCR foram realizadas, pois com o tamanho do fragmento que seria amplificado não seria possível realizar a PCR nas condições já padronizadas). Mesmo assim optamos por continuar e proceder com as etapas seguintes.

A análise de restrição com a enzima EcoRI mostrou a presença do fragmento esperado e do plasmídeo linearizado, como pode ser observado na figura 5.

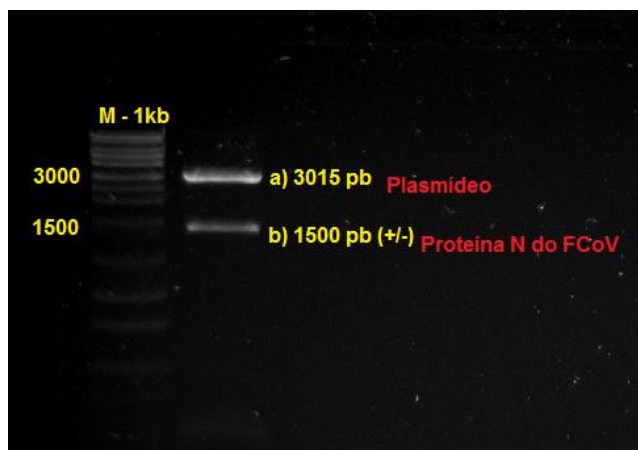


Figura 5. Gel de agarose a 1% - análise de restrição: a) fragmento do plasmídeo e b) fragmento da proteína N. Marcador de tamanho molecular 1 kb (M).

5.3. Sequenciamento

A primeira sequência obtida, quando analisada em relação aos nucleotídeos, apresentou 91% de identidade com sequências já conhecidas e depositadas no GENBANK (GU017093.1; GU017096.1; HQ012371.1). Quando analisada em relação aos seus aminoácidos a identidade obtida foi de 89% (AAY32599.1; ACT10860.1; ADC34648.1).

Na primeira sequência (clonagem) a base 214 apresentou-se como guanina (G), e na segunda sequência (PCR) apresentou-se como adenina (A), mudando o aminoácido de glicina para arginina (figura 6 e 7). Quando comparado com sequências já conhecidas e depositadas no GENBANK, a predominância foi da presença da base adenina.

A terceira sequência apresentou a mesma alteração na base 214 (presença da guanina), confirmando assim, a mutação.

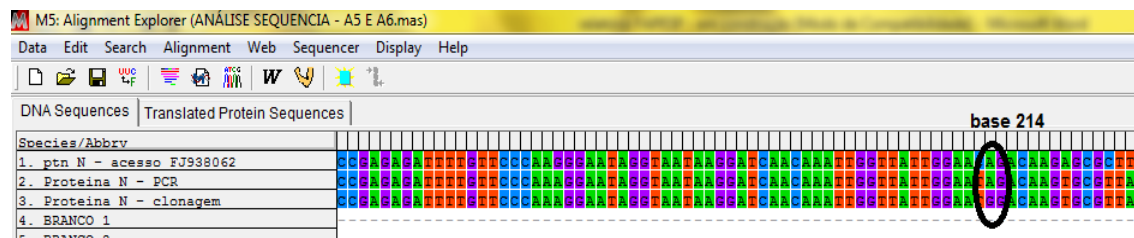


Figura 6. Alinhamento das sequências no programa Mega 5, mostrando a mudança da base 214 na sequência da clonagem – troca da base A pela base G.

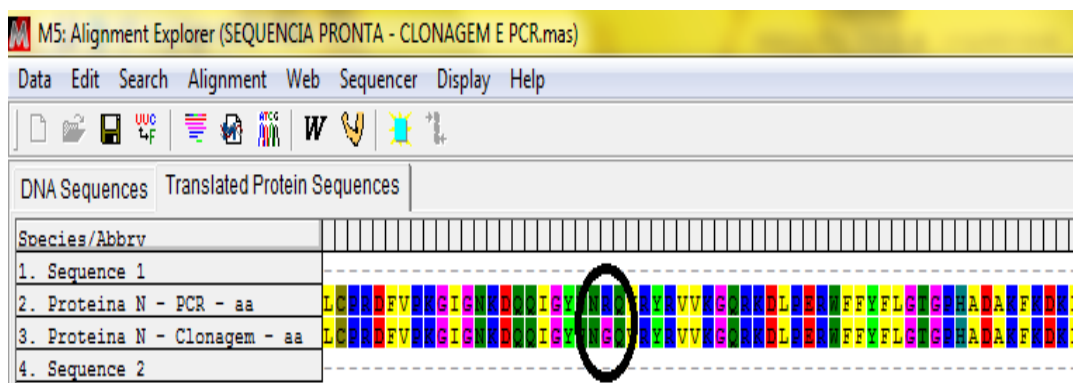


Figura 7. Alinhamento das seqüências no programa Mega 5, mostrando a mudança do aminoácido final.

5.4. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N

Na figura 8 observa-se o crescimento de quatro colônias. Após a extração do DNA plasmidial, obteve-se uma quantificação da colônia 2 analisada de 436,2 ng/μL, a qual foi utilizada nas etapas seguintes de expressão da proteína.

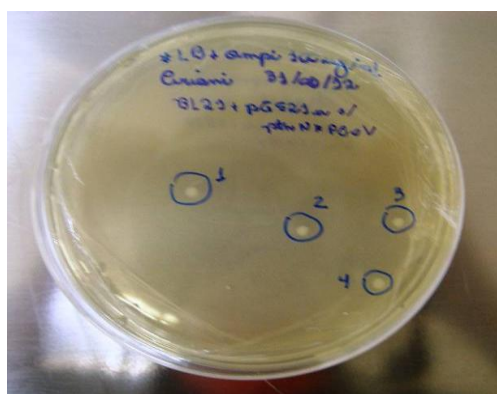


Figura 8. Crescimento de quatro colônias da bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE) com o plasmídeo pGS21a/proteína N do FCoV.

5.5. Digestão no vetor de expressão

Na figura 9 observa-se uma banda que corresponde ao fragmento esperado da proteína N, próxima ao marcador de 1500 pb, e o fragmento correspondente ao tamanho do plasmídeo linearizado.

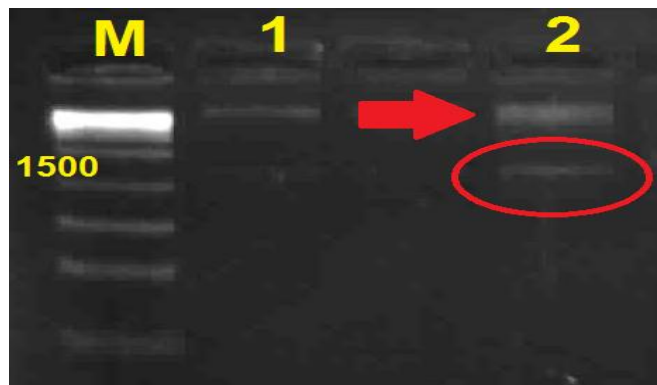


Figura 9. Digestão do plasmídeo pGS21a/proteína N com as enzimas NcoI e BamHI. M: marcador. No círculo vermelho banda da colônia 2 que corresponde ao tamanho do fragmento da proteína N (1139 pb aproximadamente). Na flecha a presença do plasmídeo linearizado (aproximadamente 7000 pb).

5.6. Síntese de novos primers e Sequenciamento do plasmídeo de expressão

Com as quatro reações realizadas, foi possível obter o contig da sequência completa da proteína N do FCoV, e com isso a confirmação da presença da sequência inserida, a orientação correta do fragmento e a fase de leitura de tradução da proteína a ser produzida (figuras 10 e 11).

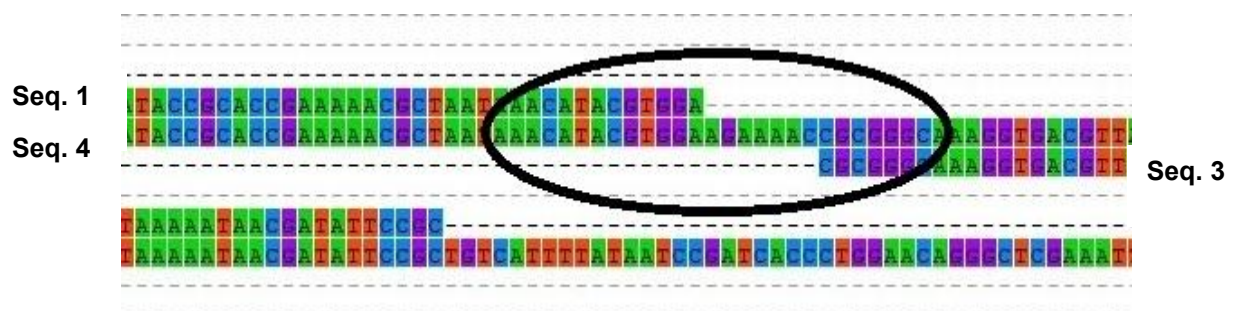


Figura 10. Análise das sequências 1, 3 e 4 no programa Mega 5 .

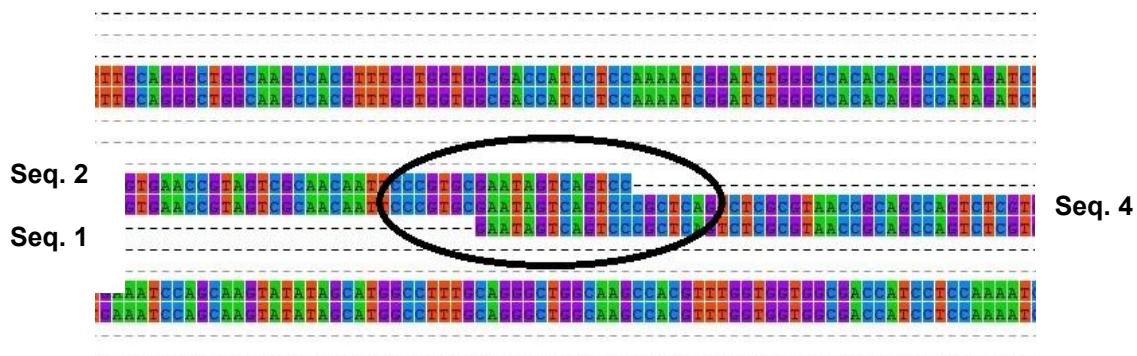


Figura 11. Análise das sequências 1, 2 e 4 no programa Mega 5

5.7. Expressão da proteína recombinante

5.7.1. Determinação do tempo de incubação após a indução e Determinação da concentração de IPTG para a indução

Os melhores tempos de incubação foram de 3 horas e 16 horas, não ocorrendo diferenças significativas entre elas. Na determinação da concentração ideal de IPTG observa-se uma maior semelhança entre as concentrações 0,5 e 1,0 mmol/L, como pode ser observado nas figuras 12, 13, 14 e 15.

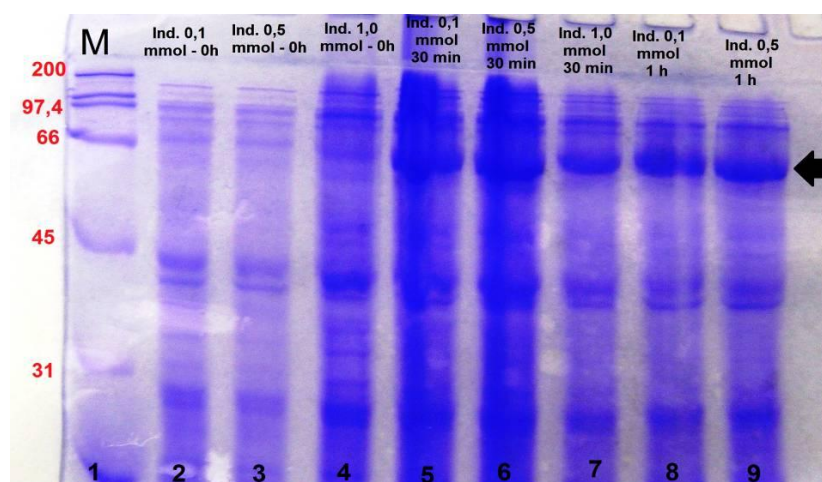


Figura 12. SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução. Coluna 1: marcador (M) – Standards/Broad Range (Bio Rad). Colunas 2, 3 e 4: momento 0 hora induzido com 0,1; 0,5 e 1 mmol/L. Colunas 5, 6 e 7: momento 30 minutos induzido com 0,1; 0,5 e 1mmol/L, mostrando a presença da banda esperada de aproximadamente 72 kDa. Colunas 8 e 9: momento 1 hora induzido com 0,1 e 0,5 mmol/L, mostrando a presença da banda esperada de aproximadamente 72 kDa.

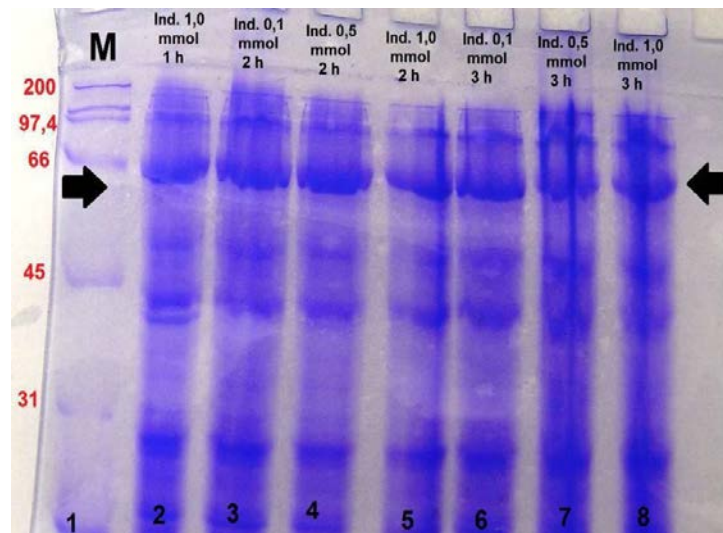


Figura 13. SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução. Coluna 1: marcador (M) – Standards/Broad Range (Bio Rad). Coluna 2: momento 1 hora induzido com 1 mmol/L. Colunas 3, 4 e 5: momento 2 horas induzido com 0,1; 0,5 e 1mmol/L. Colunas 6, 7 e 8 : momento 3 horas induzido com 0,1; 0,5 e 1 mmol/L. Todas as colunas mostrando a presença da banda esperada de aproximadamente 72 kDa.

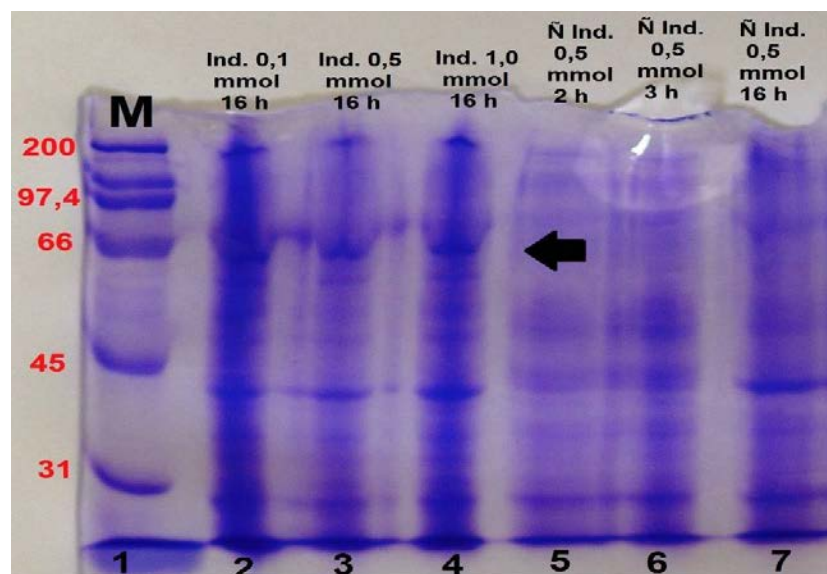


Figura 14. SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução. Colunas 1: marcador (M) – Standards/Broad Range (Bio Rad). Coluna 2, 3 e 4: momento 16 horas induzido com 0,1; 0,5 e 1 mmol/L, mostrando a presença da banda esperada de aproximadamente 72 kDa. Colunas 5, 6 e 7: culturas controles não induzidas, nos momentos 2, 3 e 16 horas, ausência da banda.

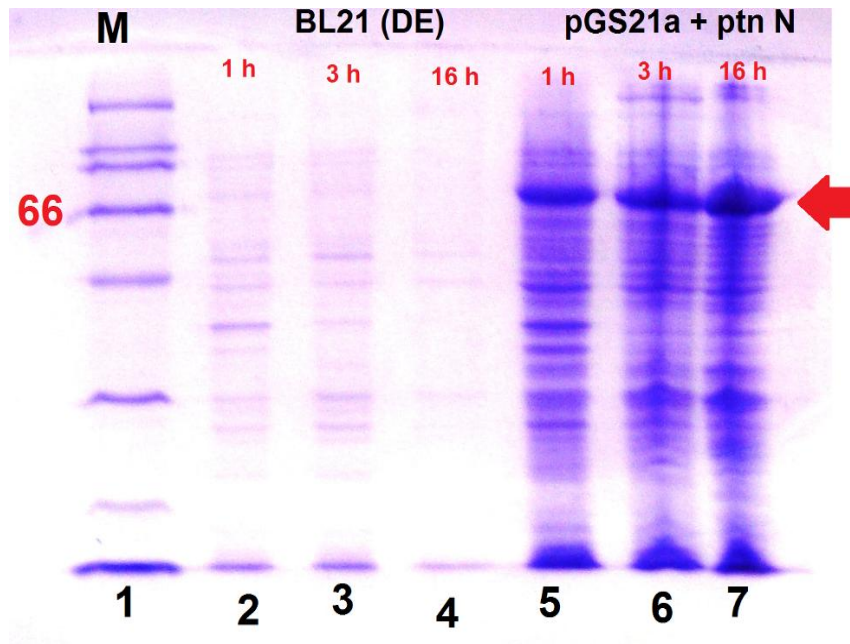


Figura 15. SDS-PAGE da determinação do tempo de incubação e da concentração de IPTG para indução. Colunas 1: marcador (M) - Standards/Broad Range (Bio Rad). Coluna 2, 3 e 4: controle com BL21 (DE) sem plasmídeo induzida com 0,5 mmol/L, mostrando a ausência da banda esperada de aproximadamente 72 kDa. Colunas 5, 6 e 7: plasmídeo pGS21 a + proteína N nos momentos 1, 3 e 16 horas, induzida com 0,5 mmol/L, mostrando a presença da banda esperada de aproximadamente 72 kDa.

5.7.2. Determinação da solubilidade da proteína recombinante

Inicialmente a proteína foi observada em grande quantidade na fração insolúvel (figura 16), apresentando uma banda correspondente ao tamanho esperado, de aproximadamente 72 kDa.

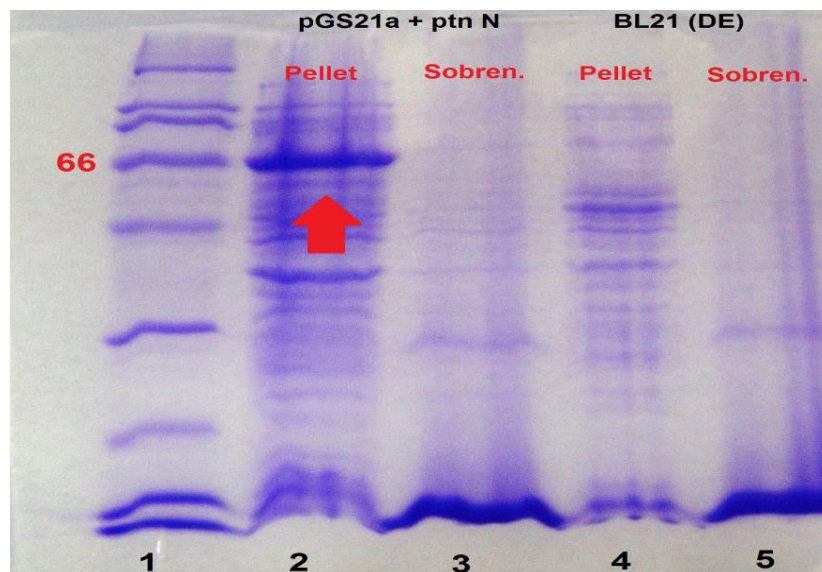


Figura 16. SDS-PAGE da determinação da solubilidade da proteína. Colunas 1: marcador (M) – Standards/Broad Range (Bio Rad). Colunas 2 e 3: plasmídeo pGS21 a + proteína N induzida com 0,5 mmol/L por 3 horas, mostrando a presença da banda esperada de aproximadamente 72 kDa na fração insolúvel (pellet) e ausência da banda na fração solúvel (sobrenadante). Colunas 4 e 5: controle com BL21 (DE) sem plasmídeo induzida com 0,5 mmol/L por 3 horas, mostrando a ausência de bandas do tamanho esperado de aproximadamente 72 kDa em pellet e sobrenadante.

5.7.3. Produção da proteína recombinante

No total foram produzidos aproximadamente 150 mL de cultura da bactéria BL21 (DE) + plasmídeo pGS21a + proteína N do FCoV, para posterior purificação. Após a mudança de protocolo de lise da bactéria na etapa de produção da proteína, houve um maior aproveitamento e rendimento da proteína produzida, que se encontrava tanto na fração insolúvel, como na fração solúvel.

5.8. Purificação da proteína recombinante

Nas frações insolúveis com eluição única de 500 mmol/L de Imidazol, observou-se o pico de detecção através da leitura a 280 nm nas frações 5, 6, 7 e 8, que foram analisadas por SDS-PAGE (figura 17), confirmando a presença das bandas do tamanho esperado, de aproximadamente 72 kDa.

Nas frações solúveis com eluição única de 500 mmol/L de Imidazol,

observou-se o pico de detecção através da leitura a 280 nm nas frações 4, 5, 6, 7 e 8, que foram analisadas por SDS-PAGE (figura 19), confirmando a presença das bandas do tamanho esperado, de aproximadamente 72 kDa. Também foram visualizadas bandas de tamanhos diferentes, que possivelmente correspondem a degradação da proteína de interesse.

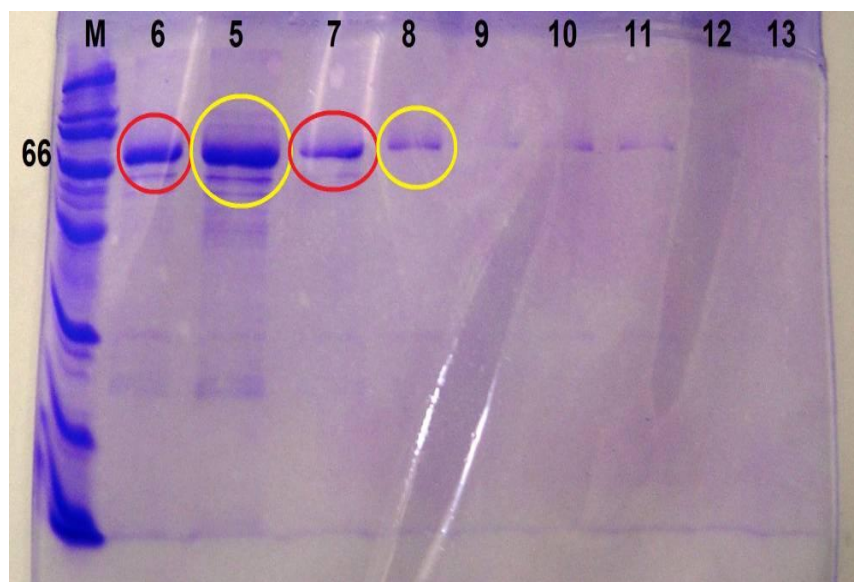


Figura 17. SDS-PAGE após purificação, com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. Frações insolúveis 6, 5, 7 e 8 mostrando as bandas de tamanho esperado (aproximadamente 72 kDa). M – marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®).



Figura 18. SDS-PAGE após purificação, com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. Sobrenadante não purificado mostrando a banda de tamanho correspondente ao da proteína desejada (aproximadamente 72 kDa). M – marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®).

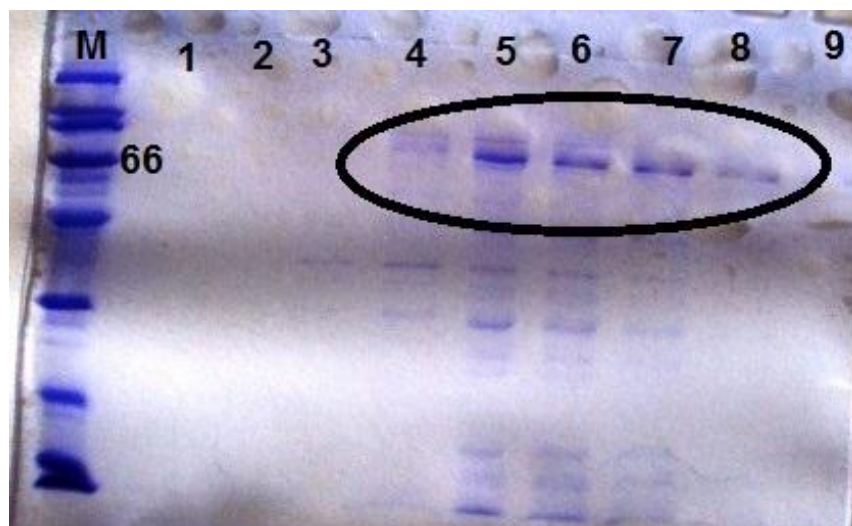


Figura 19. SDS-PAGE após purificação, com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. Frações solúveis 4,5,6,7 e 8 mostrando as bandas de tamanho esperado (aproximadamente 72 kDa). Presença de bandas de vários tamanhos (possivelmente degradação da proteína produzida). M – marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®).

5.9. Western blot

O pool de amostras de soros de gatos reagiu com as frações insolúveis 5,6 e 8, e com as frações solúveis 4, 5, 6, 7 (fraca) e 8, como pode ser observado na figura 20. A fração 7 insolúvel apresentou-se como negativa. Havendo assim a confirmação da reatividade da proteína N do FCoV produzida.



Figura 20. Western blot para confirmar a reatividade do antígeno recombinante. M – marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®). Frações insolúveis (5,6,7 e 8) e solúveis (4,5,6,7 e 8) purificadas da proteína N do FCoV produzida.

Algumas frações insolúveis e solúveis apresentaram as respectivas bandas esperadas, outras não foram visualizadas pela total transferência para a membrana. A fração 7 insolúvel apresentou resultado negativo na membrana, e se encontra presente no gel, como pode ser observado nas figuras 20 e 21 respectivamente.

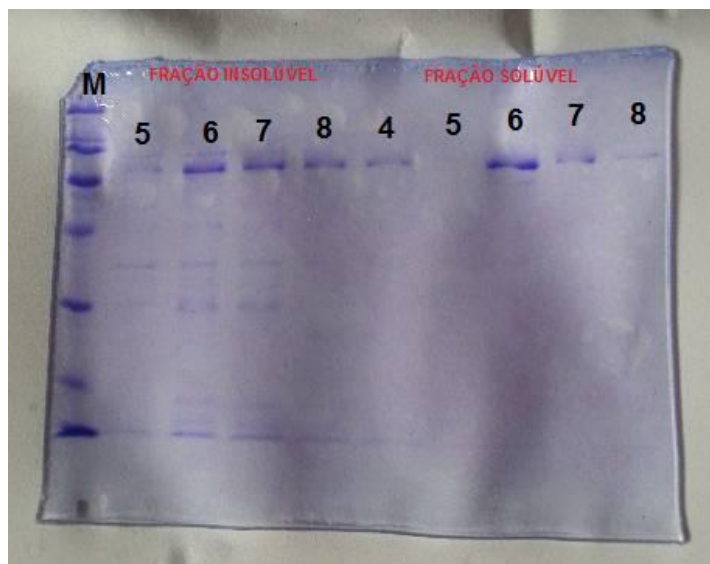


Figura 21. SDS-PAGE - gel corado com Coomassie blue após transferência de membrana. M – marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®). Frações insolúveis (5, 6, 7 e 8) e solúveis (4, 5, 6, 7 e 8) purificadas da proteína N do FCoV produzida.

5.10. Elisa Indireto

5.10.1. Testes de padronização

A solução de bloqueio que mostrou ser mais eficiente foi o BSA a 2% com tempo de incubação de 1 hora. A concentração de 200 ng/poço mostrou ser a ideal para a etapa de sensibilização da placa (figura 22 e 23). Os testes realizados com a fração do antígeno a ser utilizado mostraram que a fração insolúvel apresentou melhores resultados de reatividade (figura 24).

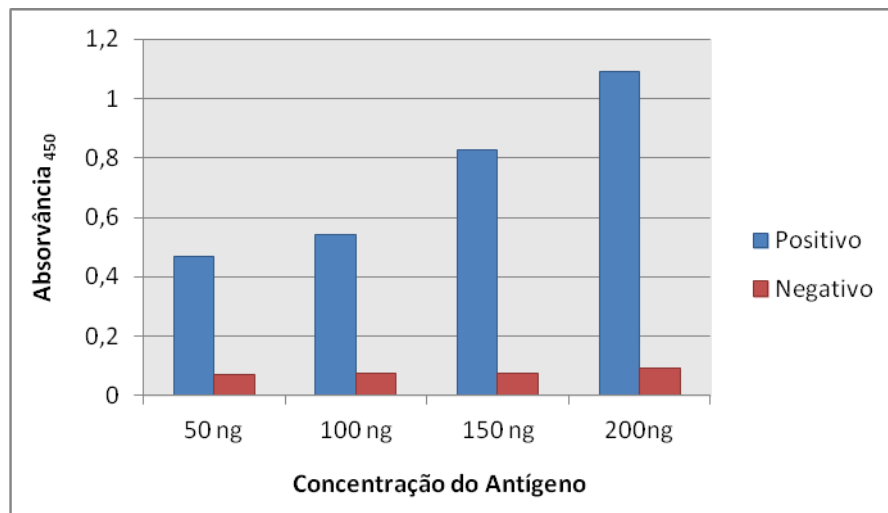


Figura 22. Determinação da concentração ideal de antígeno proteína N/FCoV utilizando 50, 100, 150 ou 200 ng/poço para a etapa de sensibilização da placa utilizando o pool A_{450} maior que 1,5 e o pool A_{450} menor que 0,3.

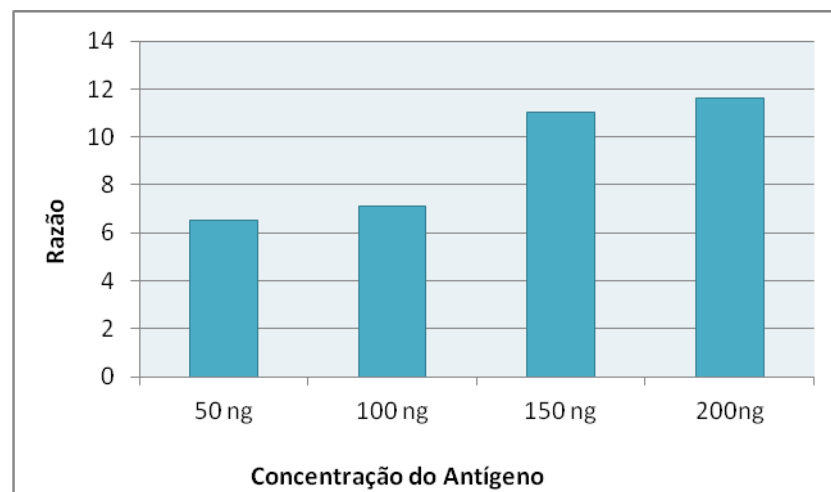


Figura 23. Razão entre a média da duplicata do pool A_{450} maior que 1,5 e da média do pool A_{450} menor que 0,3.

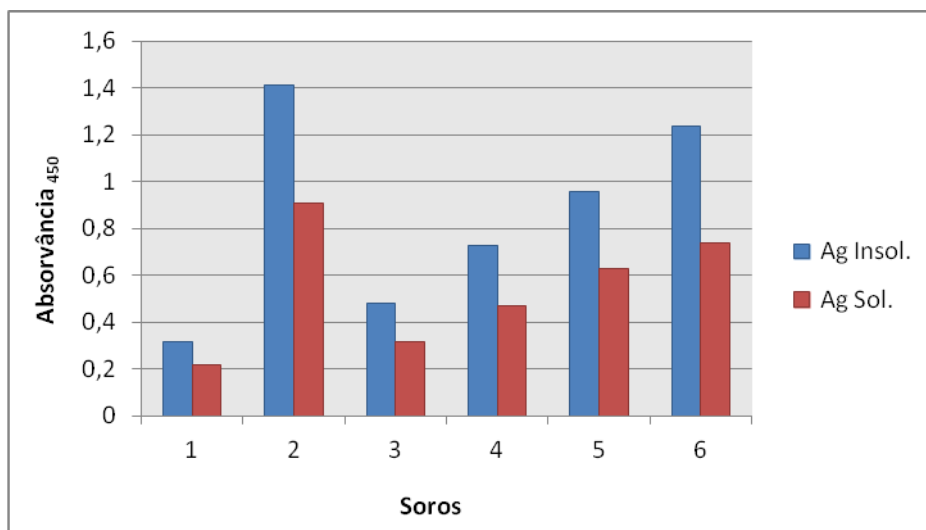


Figura 24. Comparação de seis soros diferentes entre as frações de antígeno proteína N/FCoV solúvel e insolúvel, com as condições 200 ng/poço de antígeno e diluição de soro 1/100.

A diluição de 1/200 foi a escolhida, através da maior razão entre a média da duplicata do pool A_{450} maior que 1,5 e da média do pool A_{450} menor que 0,3 (figura 25 e 26). Houve uma proximidade de resultado entre as diluições 1/200 e 1/400, e visando-se minimizar os erros de pipetagem pelo baixo volume optou-se em usar a diluição 1/200.

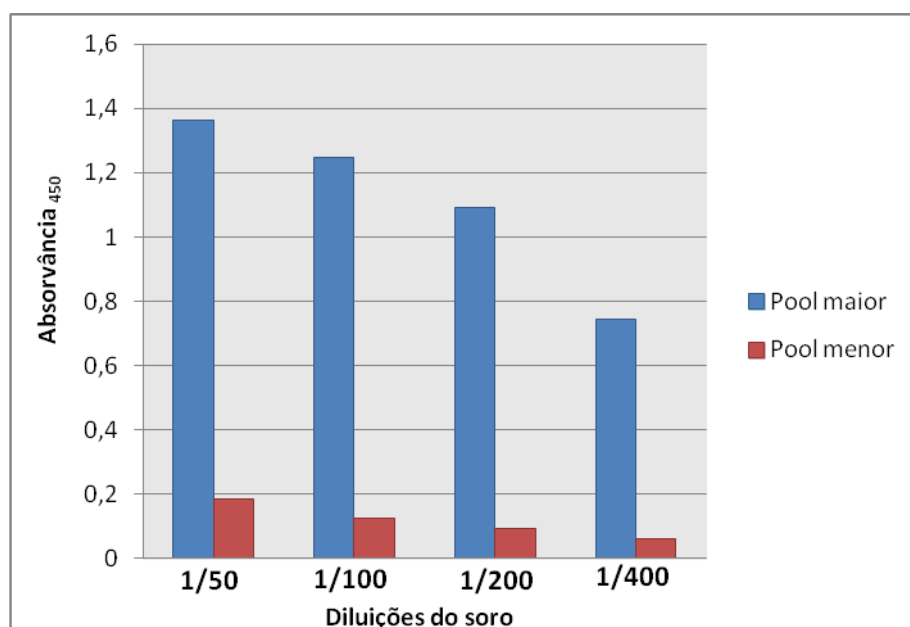


Figura 25. Determinação da melhor diluição dos soros, testando as diluições 1/50, 1/100, 1/200 ou 1/400 utilizando o pool A_{450} maior que 1,5 e o pool A_{450} menor que 0,3.

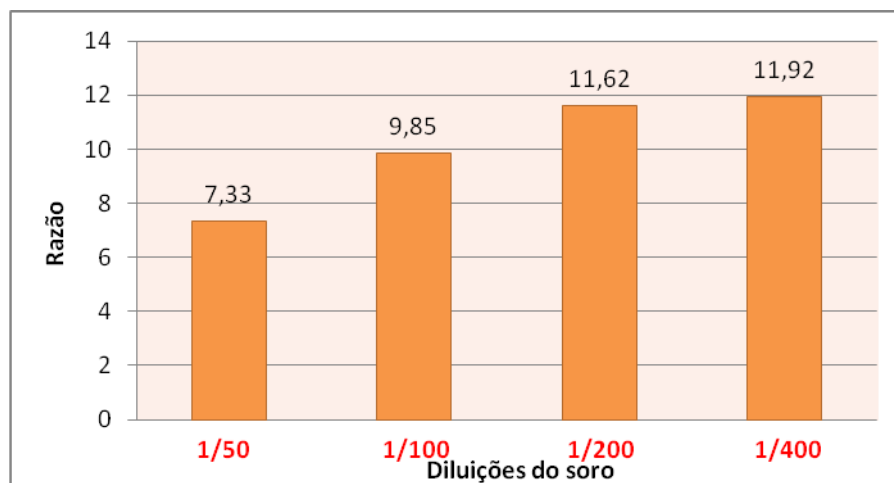


Figura 26. Razão entre a média da duplicata do pool A_{450} maior que 1,5 e da média do pool A_{450} menor que 0,3 nas diluições 1/150, 1/100, 1/200 ou 1/400.

5.11. Amostras processadas

No gráfico abaixo são demonstrados, através de intervalos, os valores de A_{450} obtidos no processamento das 382 amostras de soros de felinos. O intervalo que apresentou o maior número de amostras foi o $>$ que 0,8 que corresponde a 34,03% do total analisado (figura 27).

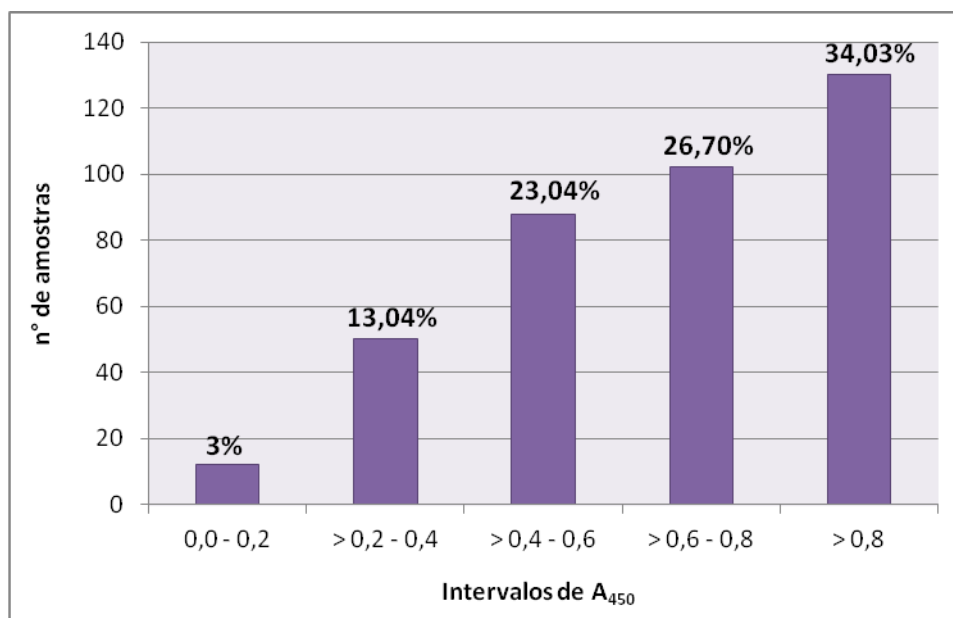


Figura 27. Resultados obtidos no processamento de 382 amostras de soro de felinos, divididos em intervalos de A_{450} : 0,0 – 0,2; > 0,2 – 0,4; > 0,4 – 0,6; > 0,6 – 0,8; > 0,8.

6. DISCUSSÃO

Na análise dos resultados observou-se que o ELISA padronizado pode ser utilizado como uma técnica sorológica quantitativa, visando a detecção de anticorpos anti-FCoV, pois mostrou-se com ótima reatividade nos soros de gatos testados.

Na obtenção da sequência que codifica a proteína N do FCoV inicialmente tentou-se utilizar como amostra biológica efusão abdominal (característica da doença) e fezes (liberação intermitente do vírus), pois são amostras mais fáceis de se obter, que podem conter a presença do vírus, não sendo necessário sedar ou anestesiá-lo o animal para colhe-las. Muitos testes foram realizados, não se obtendo resultados satisfatórios. Foi necessário então buscar novas alternativas, e optou-se por utilizar fragmentos de órgãos (como fígado, baço, rins, pulmão, omento) de animais que vieram a óbito com PIF (Pedersen et al., 2009).

Através de um fragmento de rim, foi possível a obtenção da sequência codificante da proteína N. Para a síntese do cDNA e para amplificação do fragmento desejado foram realizados diversos testes com vários kits one e 2-step, e kits com enzimas *Taq* High Fidelity, não obtendo-se os resultados esperados. Seguindo recomendações de Pedersen et al., 2009 para síntese do cDNA e amplificação foi utilizado o kit 2-Step QIAgen Longe Range 2Step RT-PCR.

Para a obtenção da sequência completa (do start códon ao stop códon) foi realizada uma primeira clonagem, para que na etapa de sequenciamento nenhuma base fosse perdida. A primeira sequência obtida apresentou 91% de identidade de nucleotídeos e 89% de identidade em aminoácidos com sequências já conhecidas e depositadas no GENBANK (não há nenhuma sequência de nosso conhecimento da proteína N, depositada com origem no Brasil). Com a sequência obtida, resolvemos fazer um novo sequenciamento com uma fração do produto purificado da PCR para comparação. Quando os primeiros primers foram desenhados (tabela 1), 126 pb antes do ATG inicial da proteína N faziam parte do produto que seria amplificado, sendo possível assim, obter a sequência completa sem perda de nenhuma base.

Na sequência 1 (clonagem) a base 214 apresentou-se como guanina (G), que na sequência 2 (PCR) apresentou-se como adenina (A), mudando o aminoácido de glicina para arginina. Quando comparado com sequências já depositadas no GENBANK, a predominância foi da presença da base adenina. Por pertencerem a grupos diferentes (a glicina – aminoácido polar neutro, e a arginina – aminoácido básico) e apresentarem características bioquímicas diferentes, a sua mudança poderia ocasionar alterações na estrutura e nas características de expressão da proteína. Com essa possível mutação que ocorreu na clonagem e pela adenina ser predominante em relação a sequências já conhecidas, optou-se por utilizar a segunda sequência que se originou de uma PCR purificada.

Inicialmente o plasmídeo foi inserido na bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE), que é uma linhagem de bactéria utilizada para expressão de proteínas, por ser deficiente em algumas proteases, evitando assim, a degradação da proteína recombinante. Após a transformação físico-química e o plaqueamento, não foi observado o crescimento de nenhuma colônia. Foi realizado contato com a empresa fornecedora, onde foi recomendado que primeiramente fosse realizada a transformação físico-química na bactéria *E.coli* cepa DH5- α , e com o DNA plasmidial extraído desta bactéria realizar uma nova transformação físico-química, agora na bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE). As recomendações foram seguidas, obtendo-se o resultado esperado.

Para a produção da proteína recombinante, inicialmente seria realizada a subclonagem no vetor de expressão pET 28a, que é um sistema de clonagem e expressão de proteínas bastante utilizado e recomendado por gerar grande produção da proteína de interesse, mas devido a presença de dois stop códon (TAA) antes do ATG inicial da proteína N do FCoV (presente nos 126 pb antes deste ATG) não foi possível dar continuidade no momento, e para resolver este problema seria necessário desenhar primers com sítios de restrição. Optamos pelo uso do plasmídeo de expressão pGS21a, da empresa GenScript (Fastbio).

A expressão de genes recombinantes em *E. coli* é dificultada pela presença de códons raros (ou tóxicos) utilizados pelo gene recombinante que diferem daqueles utilizados pela bactéria. Isso, geralmente, ocorre na presença dos códons de arginina (AGA e AGG), isoleucina (AUA) leucina (CUA) e prolina

(CCC). Com o intuito de resolver esses possíveis problemas na expressão, a sequência foi otimizada pela empresa visando um melhor rendimento de expressão.

O processo de lise da bactéria utilizado inicialmente influenciou nos resultados obtidos, onde a proteína foi visualizada apenas na fração insolúvel. Com a mudança de protocolo, foi possível a detecção da proteína nas frações solúvel e insolúvel.

Na etapa de purificação com eluição única de 500 mmol/L de imidazol foi observado nas frações insolúvel e solúvel a presença das bandas esperadas, frações que foram selecionadas por apresentarem pico na leitura A_{280} . Foi observada também a presença de bandas inespecíficas no gel de purificação das frações solúveis, que pode ser justificado pelo fato destas frações terem permanecido mais de 24 horas sem adição de inibidor de protease, sendo possivelmente bandas que indiquem degradação da proteína produzida.

Ao realizar o Western Blot a fração 7 do antígeno insolúvel apresentou-se negativa na membrana de transferência, mas estava presente no gel corado com Coomassie blue, podendo esta transferência não ter corrido ou esta fração não conter a proteína de interesse apesar de ter apresentado pico na leitura A_{280} .

A técnica de ELISA indireto mostrou que a proteína N do FCoV produzida é antigênica, demonstrando capacidade de interação com anticorpos de um gato naturalmente infectado pelo FCoV. Quando testados em comparação os antígenos solúvel e insolúvel, houve uma diferença significativa entre eles, onde o insolúvel apresentou uma maior reatividade com os anticorpos específicos presentes nos soros dos gatos, demonstrando assim que houve interferência da degradação do antígeno solúvel, onde a sua capacidade de interação ficou diminuída.

Como não há trabalhos de comparação para o nosso ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-FCoV com uso de proteína recombinante de nucleocapsídeo, partimos de valores na padronização (tipo de bloqueio, diluição dos soros, concentração do antígeno) citados por autores que trabalham com coronavírus de outras espécies, como o canino, o aviário e o humano (SARS) (Pratelli et al., 2002; Timani et al., 2004; Woo et al., 2004; Carattoli et al., 2005; Gibertoni et al., 2010).

O uso da proteína N como antígeno recombinante é bastante comum, e tem sido utilizado para o diagnóstico do SARS principalmente, onde a técnica é considerada de elevada especificidade e sensibilidade. Segundo Timani et al., 2004 a comparação dos resultados obtidos no ELISA com uso de proteína recombinante com os resultados obtidos com o kit de diagnóstico disponível comercialmente que utiliza uma mistura de proteínas virais, mostrou que 81,3% dos soros testados pelo ELISA com uso da proteína N recombinante foram positivos 10 dias pós-infecção, e apenas 56,3% dos soros testados pelo kit comercial foram positivos no mesmo período. Com os resultados obtidos até o momento no ELISA padronizado não foi possível determinar a sensibilidade e especificidade do teste como relatado acima por Timani et al.; 2004, foi possível determinar apenas a reatividade da técnica com uso da proteína N recombinante.

Apesar de o cultivo celular ser considerado de difícil realização para o FCoV, tem sido demonstrado por alguns autores que a obtenção do antígeno por esta técnica pode ser realizada e apresentar resultados satisfatórios utilizando o sorotipo II. Segundo Pratelli, 2008 o ELISA com uso de antígeno produzido através do cultivo celular (FCoV sorotipo II) demonstrou elevada sensibilidade e especificidade (100% e 92%), onde mostrou-se capaz de detectar as respostas contra o FCoV sorotipo I e sorotipo II. Foi possível também a obtenção de soros padrão positivo e negativo, onde as amostras foram testadas por três técnicas diferentes, confirmando a positividade e a negatividade das amostras. A obtenção de soros padrão positivo e negativo não foi possível em nosso trabalho pela alta porcentagem de animais que apresentam anticorpos anti-FCoV, onde cerca de 90% dos felinos domésticos apresentam títulos. Por isso foi realizado o teste em 90 amostras aleatórias, e destas foram selecionados 5 soros com A_{450} maior que 1,5 e feito um pool, e selecionados 5 amostras com A_{450} menor que 0,3 e feito um pool também. Os dois pools eram aplicados em todas as placas.

A escolha do melhor bloqueio para diminuir as reações inespecíficas, concentração e tipo de antígeno, e a diluição dos soros foram os principais fatores analisados. Os testes de diluição demonstraram que a diluição 1/400 seria a mais indicada, porém com valor muito próximo a 1/200, optando-se pelo seu uso para tentar diminuir as margens de erro por pipetagem.

Ao longo da padronização notou-se que mesmo com a adição de inibidor de protease a fração de antígeno utilizada, ao ser congelada e descongelada mais de três vezes ia perdendo sua reatividade. Com isso, foi preciso realizar várias frações do antígeno para o uso que era diário. Observamos que o tipo de armazenamento influencia na manutenção da antigenicidade da proteína recombinante produzida.

Na etapa de processamento das amostras, notou-se que a diluição dos soros só poderia ser feita no momento de sua aplicação nos poços. Alguns testes foram feitos na tentativa de minimizar os erros em que essa etapa implicaria. Cada soro testado levava cerca de um minuto, entre a sua homogeneização com o diluente e aplicação da amostra. O soro testado no primeiro poço da placa era repetido e testado novamente no último poço da mesma placa, para comparações de A_{450} . Foram usadas por placa seis strips verticais (que corresponde a meia placa). Após a leitura, notou-se que o soro analisado no início e no final apresentava uma diferença de A_{450} em média de 0,3. Cálculos foram realizados na tentativa de corrigir essa diferença, mas não foi possível realizar essa correção, onde mais testes deverão ser feitos para resolução do problema, já que a técnica padronizada é quantitativa.

A análise das amostras foi dificultada pelo problema de obtenção de soros padrão positivo e negativo, já que a maioria dos felinos domésticos são infectados pelo FCoV. O ELISA apresentou capacidade discriminativa e quantitativa, onde foi possível discriminar valores de A_{450} de 0,1 a 1,8.

Para a análise dos dados obtidos na sorologia, o objetivo seria de correlacionar os nossos valores do ELISA com os dados clínicos e de carga viral obtidos pela doutoranda Aline Santana da Hora, porém não foi possível analisar a fundo esses dados, por algumas dificuldades encontradas pela mesma, que levou a um atraso, não estando estes dados disponíveis. Assim que estes dados estiverem disponíveis as análises serão correlacionadas.

O ELISA padronizado apresenta ótima reatividade, com alta capacidade de discriminação. Novos testes serão feitos no intuito de validar a técnica, seguindo as recomendações da OIE.

7. CONCLUSÕES

A proteína recombinante de nucleocapsídeo do FCoV produzida pode ser utilizada como antígeno na prática para exame sorológico na detecção de soros de gatos anti-FCoV, pois mostrou-se com tamanho esperado, antigenicidade e com ótima reatividade no projeto desenvolvido.

O ELISA indireto padronizado pode ser utilizado e aplicado na prática como um teste seguro, rápido e barato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

a- ADDIE, D.D.; McLANCHLAN, S.A.; GOLDER, M.; RAMSEY, I.; JARRET, O. Evaluation of an in-practice for feline coronavirus antibodies. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 63-67, 2004.

b- ADDIE, D. D.; PALTRINIERI, S.; PEDERSEN, N. C. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 6, n. 2, p. 125-130, 2004.

ADDIE, D.D.; JARRETT, O. Feline Coronavirus Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and the Cat**. 3 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 11, p. 88-102.

BATTILANI, M.; BALBONI, A.; BASSANI, M. et al. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. **New Microbiologica**, v.33, p. 387-392, 2010.

CAN-SAHNA, Z.; ATASEVEN, V.S.; PINAR, D.; OGUZOGLU, T.Ç. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. **Journal of Feline Medicine and Surgery**.v. 9, p. 369-372, 2007.

CARATTOLI, A.; DI BONITO, P.; GRASSO, F.; GIORGI, C.; BLASI, F.; NIEDRIG, M.; CASSONE, A. Recombinant Protein-Based ELISA and Immuno-Cytochemical Assay for the Diagnosis of SARS. **Journal of Medical Virology**. v. 76, p. 137–142, 2005.

CHANDLER, E.A.; GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3 edição. São Paulo: Roca, 2006. 632 p.

CORNELISSEN, E.; DEWERCHIN, H.L.; VAN HAMME, E.; NAUWYNCK, H.J. Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus antigens on

infected cells isolated from cats with FIP. **Veterinary Microbiology**. v. 121, p.131-137, 2007.

DAIHA, M.C. Peritonite Infecciosa Felina. In: SOUZA, H.J.M. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2003. p.363-373.

a. FOLEY, J. E.; POLAND, A.; CARLSON, J.; PEDERSEN, N. C. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 9, p. 1307-1312, 1997.

b. FOLEY, J. E; POLAND, A.; CARLSON, J.; PEDERSEN, N.C. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 210, n. 9, p. 1313-1318, 1997.

GIBERTONI, A.M.; GONÇALVES, M.C.M.; MONTASSIER, M.F.S.; FERNANDES, C.C.; MONTASSIER, H.J. Clonagem, expressão e caracterização da nucleoproteína recombinante do vírus da Bronquite infecciosa em *Escherichia coli* e em *Pichia pastoris*. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.1-9, 2010.

GIORI, L.; GIORDANO, A.; GIUDICE, C.; GRIECO, V.; PALTRINIERI, S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. **Journal of Small Animal Practice**. v. 52, p. 152-157, 2011.

HARTMANN, K.; BINDER, C.; HIRSCHBERGER, J.; COLE, D.; REINACHER, M.; SCHROO, S.; FROST, J.; EGBERINK, H.; LUTZ, H.; HERMANN, W. Comparison of Different Tests to Diagnose Feline Infectious Peritonitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.17, p.781-790, 2003.

HARTMANN, K. Feline infectious peritonitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, n. 1, p. 39-79, 2005.

HERREWEGH, A.A.P.M.; GROOT, R.J.; CEPICA, A.; EGBERINK, H.F.; HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P.J.M. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p. 684-689, 1995.

HORA, A.S.; ASANO, K.M.; GUERRA, J.M.; MESQUITA, R.G.; MAIORKA, P.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Intrahost Diversity of Feline Coronavirus: A Consensus between the Circulating Virulent / Avirulent Strains and the Internal Mutation Hypotheses?. **The Scientific World Journal**. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/572325/>>. Acesso em : 30 mai. 2013. doi: 10.1155/2013/572325.

HOSKINS, J.D.; LOAR, A.S. Feline infectious diseases. **Veterinary Clinics of North America**. v.23, n.1, p.2-11, 1993.

KIPAR, A.; MAY, H.; MENDER, S.; WEBER, M.; LEUKERT, W.; REINACHER, M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 3, p. 321-330, 2005.

LAI, M. M. C.; HOLMES, K. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.p. 951-969.

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.

LE PODER, S. Feline and Canine Coronaviruses: Common Genetic and Pathobiological Features. **Advances in Virology**. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/av/2011/609465/>>. Acesso em : 20 mai. 2013. doi: 10.1155/2011/609465.

MOTA, A.L.D.R. Relação entre apresentação clínica, carga viral e titulação de anticorpos na peritonite infecciosa felina. 2010. 112 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.

MYRRHA, L.W.; SILVA, F.M.F.; PETERNELLI, E.F.O.; JUNIOR, A.S.; RESENDE, M.; ALMEIDA, M.R. The Paradox of Feline Coronavirus Pathogenesis: A Review. **Advances in Virology**. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/av/2011/109849/>>. Acesso em : 20 nov. 2011. doi: 10.1155/2011/109849.

NORSWORTHY, G.D. Feline infectious peritonitis in: NORSWORTHY, G.D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S.F.; TILLEY, L.P. **The Feline Patient**. 3rd. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p. 97-98.

OLIVEIRA, F.N.; RAFFI, M.B.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Peritonite infecciosa felina: 13 casos. **Ciência Rural**. v.33, n.5; p. 905-911, 2003.

PEDERSEN, N. C. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 218, n. p. 529-550, 1987.

PEDERSEN, N.C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 225-258, 2009.

PEDERSEN, N.C.; LIU, H.; DODD, K.A.; PESAVENTO, P. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. **Viruses**. v.1 , p. 166-184, 2009.

PRATELLI, A.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; PALMIERI, A.; CIRONE, F.; TINELLI, A.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of canine coronavirus antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. **Journal of Virological Methods**. v. 102, p. 67-71, 2002.

PRATELLI, A. Comparison of serologic techniques for detection of antibodies against feline coronaviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 20, p. 45-50, 2008.

PRATELLI, A.; YESILBAG, K.; SINISCALCHI, M.; YALÇM, E.; YILMAZ, Z. Prevalence of feline coronavirus antibodies in cats in Bursa province, Turkey, by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 881 – 884, 2009.

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

SATOH, R.; FURUKAMA, T.; KOTAKE, M.; TAKANO, T.; MOTOKAWA, K.; GEMMA, T.; WATANABE, R.; ARAI, S.; HOHDATSU, T. Screening and identification of T helper 1 and linear immunodominant antibody-binding epitopes in the spike 2 domain and the nucleocapsid protein of feline infectious peritonitis virus. **Vaccine**. v.29, p. 1791-1800, 2011.

SHIBA, N.; MAEDA, K.; KATO, H.; MOCHIZUKI, M.; IWATA, H. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. **Veterinary Microbiology**. v. 124, p. 348-352, 2007.

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. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SYKES, J.E. Immunodeficiencies caused by Infectious Diseases. **Veterinary Clinics of Small Animal**. v. 40, p. 409-423, 2010.

TIMANI, K.A.; YE, L.; YE, L.; ZHU, Y.; WU, Z.; GONG, Z. Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid

protein for serodiagnosis of SARS. **Journal of Clinical Virology**. v.30, p. 309-312, 2004.

VENNEMA, H.; POLAND, A.; HAWKINS, K.F. et al. A comparison of the genomes of FECV and FIPV and what they tell us about the relationships between feline coronaviruses and their evolution. **Feline Practice**. v.23, p.40-44, 1995.

VENNEMA, H.; POLAND, A.; FOLEY, J.; PEDERSEN, N. C. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, v. 243, n. 1, p. 150-157, 1998.

WOO, P.C.Y.; LAU, S.K.P.; WONG, L.B.H.L.; TSOI, H.W.; FUNG, A.M.Y.; CHAN, K.H.; TAM, V.K.P.; PEIRIS, J.S.M.; YUEN, K.Y. Detection of Specific Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.5, p. 2306-2309, 2004.

WOO, P.C.Y.; HUANG, Y.; LAU, S.K.P.; YUEN, K.Y. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. **Viruses**. v. 208, p. 1804-1820, 2010.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho submetido para publicação na revista Veterinary Microbiology, que se trata de uma revista internacional com fator de impacto 3.248.

A revista é voltada às doenças de animais domésticos causadas por bactéria, fungos e vírus.

O texto foi redigido seguindo as instruções dos editores.

Maiores informações podem ser obtidas através do site http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503320/authorinstructions

9.1. Normas de publicação da revista “Veterinary Microbiology”

Guide for Authors

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest.

Reviews of topics in veterinary bacteriology, mycology and virology should provide short, readable, well- referenced, up-to-date overviews of current, emerging, or neglected subjects in the discipline. Syntheses of information from diverse sources, providing clarification of areas of confusion or uncertainty, are especially desirable. It is anticipated that these reviews will provide overviews of important topics to the benefit of curious-but-busy readers of Veterinary Microbiology.

Reviews should carry titles which are creative and provocative, but nonetheless descriptive, and emphasize current status and future directions of research.

Historical vignettes are useful in setting the stage for addressing important contemporary questions, but should not ordinarily be the basis for an article.

Manuscripts may include controversial views, if presented in balanced fashion and supported by evidence; informed speculation is welcome. For reasons of credibility, it is preferred that reviews be written by authors from more than one research center.

Authors may find it useful to contact the Reviews Editor J. Glenn Songer (jgsonger@iastate.edu), perhaps with an outline of a proposed review, before submitting. Articles should be about fifteen pages of double-spaced type, supported by illustrative material. Figures are welcomed and articles should not have more than 50 references. Manuscripts should be submitted through the EES electronic submission system, taking care to clearly indicate that it is a review article.

Manuscripts will, where possible, be fast-tracked for publication, but will go through the normal review procedure. Final decisions on bacteriology and mycology topics will be handled by Glenn Songer and for virology by Uwe Truyen.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are requested to provide the names of up to 4 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission (for both regular papers and reviews). Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication free

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication free for this journal is \$USD 3,000, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy
www.elsevier.com/openaccesspricing

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order: Title (should be clear, descriptive and not too long) Name(s) of author(s) Complete postal address(es) of affiliations Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author Present address(es) of author(s) if applicable Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent; Abstract; Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index. Introduction; Material studied, area descriptions, methods, techniques; Results; Discussion; Conclusion; Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc; References; Tables; Figure.

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their

own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:
a. *For periodicals*: Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.

b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. Vet. Microbiol. 40, 1–4.

c. *For books*: Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

d. *For multi-author books*: Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the *International List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is Vet. Microbiol.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)

- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetmic>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

9.2. Artigo

Development and application of an indirect ELISA with the recombinant nucleocapsid protein of feline coronavirus (FCoV) for serum antibody quantification in naturally infected cats

A.C.S. Almeida¹, V.F.Zadra¹, A.S. Hora^{2,3}, P.E. Brandão^{2,3}, J.P. Araujo Jr¹.

1. Laboratory of Virology and Molecular Diagnostics, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (Universidade Estadual Paulista - UNESP), Botucatu, São Paulo, SP, Brazil

E-mail: arianicristina@yahoo.com.br

2. Laboratory of Applied Molecular Biology and Serology, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science – University of São Paulo (Universidade de São Paulo - USP), São Paulo, SP, Brazil

3. Coronavirus research group – University of São Paulo (Universidade de São Paulo - USP), São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Among the serological tests used to detect anti-FCoV antibodies, ELISA is the most sensitive and recommended method. FCoV is difficult to culture, and thus, the use of recombinant antigens is required for ELISA. The use of the FCoV nucleocapsid (N) protein as a recombinant antigen is advantageous because this protein is conserved, highly immunogenic and among the most-produced proteins during viral infection. The aim of this study was to standardize and apply an indirect ELISA that uses recombinant N protein to detect anti-FCoV antibodies in sera from naturally infected cats. A kidney fragment from a feline that died from feline infectious peritonitis (FIP) was used to extract viral RNA, which was then amplified by RT-PCR and used to sequence the N protein. The N protein sequence was synthesized with codons optimized for expression in *Escherichia coli* and inserted into the plasmid pGS21a. After production, the protein was purified. Western blotting was performed with pooled sera from cats. During standardization of the indirect ELISA, the type of blocking, concentration, type of antigen and serum dilution were determined. Overall, 382 feline serum samples were tested. The results showed that the produced protein exhibited very good reactivity in the indirect ELISA. A₄₅₀ differences were

observed among the tested sera, in which a high discriminatory capacity was demonstrated, with A_{450} values ranging from 0.1 to 1.8, thus demonstrating that the test is quantitative. The standardized indirect ELISA with recombinant N protein for the detection of anti-FCoV antibodies is an efficient method that could be applied to field samples.

Keywords: Feline coronavirus, indirect ELISA, cats.

1. INTRODUCTION

FCoVs belong to the family *Coronaviridae* and the order *Nidovirales*. They are enveloped single-stranded RNA viruses with a positive polarity that contain the largest RNA genome known to date; the viruses replicate via a single mechanism that results in a high recombination rate (Lai & Homes, 2001). FCoV is responsible for feline infectious peritonitis (FIP), one of the most important infectious diseases to affect both domestic and wild cats.

FIP is an infectious, immune-mediated, systemic, progressive and fatal disease. FCoV is divided into 2 different biotypes, feline enteric coronavirus (FECoV) and feline infectious peritonitis virus (FIPV), which are indistinguishable with regard to physical and antigenic properties (Addie & Jarrett, 2006; Pratelli et al., 2009).

The genomic structures of all coronaviruses are similar. The FCoVs' genomes exhibit approximately 29,000 nucleotides. These viruses display the following 11 open reading frames (ORFs): 2 large ORFs that encode polymerase, 4 ORFs that encode the structural spike (S), membrane (M), nucleocapsid (N) and envelope (E) proteins and 5 ORFs that encode the nonstructural proteins 3a, 3b, 3c, 7a and 7b (Pedersen, 2009; Myrra et al., 2011).

The N protein is one of the most abundantly produced proteins during viral infections, and it plays an important role in viral replication, assembly and host immunity, in addition to being well conserved and highly immunogenic. The use of the N protein for cloning and production of recombinant proteins for serological assays is very common (Lai & Homes, 2001; Batillani et al., 2010; Woo et al., 2010).

Antemortem diagnosis of FIP is difficult (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009) because there is no currently available test that can differentiate between FECoV and FIPV. According to Hora et al., 2013, FIPV can not only undergo internal mutation within the infected feline and then induce disease but can also be transmitted as a virulent strain. In many cases, a presumptive diagnosis can be made by assessing the history, clinical findings, laboratory results (blood count, biochemical, evaluation of effusion) and coronavirus antibody titers, while excluding similar diseases. A definitive diagnosis is made by necropsy and histopathology (Oliveira *et al*, 2003; Addie & Jarrett, 2006; Addie et al., 2009).

When performed correctly and interpreted in an optimal context, the detection of anti-FCoV antibodies contributes to diagnosis (Addie & Jarret, 2006; Sharif et al., 2010). Additionally, antibody level monitoring in cats that live in densely populated environments is possible through serology, thus enabling the identification of virus-positive animals. Moreover, the monitoring of cats used in reproduction can be performed using this method. Serology can also be important for monitoring outbreaks in catteries and especially for monitoring these catteries until they become free of FCoV infection and can even be used in the creation of FCoV-free catteries (Pratelli, 2008; Sharif et al. 2010).

Recombinant proteins are potentially inexpensive, safe and relatively easy to manufacture and also represent a safer way to prepare viral antigens because these antigens can be obtained without propagating the live virus (Caratolli et al., 2005). However, there is no information on the use of recombinant proteins as antigens for anti-FCoV antibody detection. Thus, the objective of this study was to standardize and apply an indirect ELISA using the recombinant N protein to detect anti-FCoV antibodies in sera from naturally infected cats.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Obtaining the viral RNA, amplification of the N gene by RT-PCR and sequencing

A kidney fragment from a feline that died from FIP was used as the biological sample. Viral extraction was performed with the Trizol[®] LS Reagent (Invitrogen[™]; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the

manufacturer's recommendations. Sense (GCAACTACTGCCACAGGATGGGC) and antisense primers (CGCAGACTACTGTCAGGCACACC) were designed from the N protein gene sequence (GenBank accession no. NC_002306.3) to amplify the entire N gene ORF. cDNA synthesis and amplification of the fragment encoding the FCoV N protein were performed from the extracted viral RNA with the QIAGEN® LongRange 2Step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations. The PCR conditions were selected according to Pedersen et al., 2009. The amplified product was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel and was subsequently purified with the illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare®, Little Chalfont, UK), according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen®). The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/Life Technologies) and the automated sequencer ABI 3500 (Applied Biosystems) were used for sequencing.

2.2. Obtaining the expression plasmid

Using the FCoV N protein sequence (GENBANK accession no. KF435071), the best conditions for optimization were evaluated, and GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ, USA) was requested to synthesize the complete 1,131-bp gene into the pUC57 vector, as well as to subclone the gene into the pGS-21a expression vector. The fragment of interest between the cloning sites NcoI and Bam HI, with the histidine tail at the amino-terminal end, was requested. During the optimization, rare (or toxic) bacterial codons in the N protein sequence were replaced to obtain a better yield in the expression step.

2.3. Expression of the FCoV N protein

The pGS-21a plasmid + N protein were transformed into the *E. coli* strain DH5α, and this plasmid DNA was subsequently extracted and newly transformed into the *E. coli* strain BL21 (DE). Protein expression was induced by the addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The culture was centrifuged at 3,000 x g for 15 minutes at 4°C, and the pellet was resuspended in lysis buffer (20 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 1 mg/mL lysozyme and 20 mmol/L imidazole) with Protease Inhibitor Mix

HP (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Next, the culture was subjected to lysis by sonication and centrifuged again. The supernatant was collected, and the pellet was resuspended in denaturing solution (20 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole and 8 M urea). The samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

2.4. Purification of the FCoV N protein

Purification of the soluble and insoluble fractions was performed with a His TrapTM HP column (GE Healthcare Life Science), according to the manufacturer's recommendations. Phosphate buffer (20 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl and 20 mmol/L imidazole) was used as the binding and washing solution and, in the elution step, a single concentration of 500 mmol/L imidazole in phosphate buffer (20 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4, and 0.5 mol/L NaCl) was used.

2.5. Western blotting

The selected fractions were separated by SDS-PAGE and then transferred to a nitrocellulose membrane (0.22- μ m pore size; ProtranTM; Whatman plc, Maidstone, Kent, UK), using Bjerrum and Schafer-Nielsen buffer (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20% methanol and 3.35 mL of 10% SDS, pH 9.2). The following steps were performed with the Immun-Blot Assay Kit (Bio Rad® Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The primary antibody was pooled sera from 5 cats, and the secondary antibody was a peroxidase-conjugated rabbit (IgG) anti-cat IgG.

2.6. Standardization of the indirect ELISA

The main factors tested in the standardization steps were the type of blocking, concentration and type of antigen and the serum dilution. To determine the positive and negative standards, 90 random samples were tested; 5 of these with A_{450} values greater than 1.5 and 5 with A_{450} values less than 0.3 were selected to create 2 pools.

2.7. Application of the indirect ELISA

A total of 382 cat serum samples were processed in 96-well rigid, flat-bottom ELISA microplates (Maxisorp®; Nalge Nunc International, Penfield, NY, USA). The microplate sensitization was performed as follows: 100 µL/well antigen, diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, at a concentration of 200 ng/well, was placed in a moist chamber for 16 to 17 hours at 4°C for adsorption. After this incubation, the plate was washed 5 times with phosphate-buffered saline plus Tween-20 (PBST), pH 7.4. These washes occurred between all following steps. For the blocking step, 2% bovine serum albumin (BSA), diluted in carbonate-bicarbonate buffer at pH 9.6, was used; 300 µL/well was applied for 1 hour in a moist chamber at 37°C. The cat sera were diluted 1:200 in PBST with 2% BSA, and 100 µL/well was applied and incubated for 1 hour in a moist chamber at 37°C. The peroxidase-conjugated rabbit IgG anti-cat IgG was diluted at 1:1000 in PBST with 2% BSA and added to the wells before a 1-hour incubation in a moist chamber at 37°C. In the next step, 100 µL of a chromogenic substrate solution that contained 10 mL of citrate/acetate buffer (pH 6.0), 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB) (10 mg/mL diluted in DMSO) and 2.5 µL of 30% hydrogen peroxide was added to each well. After a 15-minute incubation with gentle agitation at room temperature, the enzymatic reactions were blocked by the addition of 2 mol/L HCl at 50 µL/well. The microplates were read at a wavelength of 450 nm.

3. RESULTS

The complete FCoV N protein coding sequence comprised 1,131 bp and 376 amino acids. A time of 16 hours and an IPTG concentration of 0.5 mmol/L were determined to be optimal for the expression step. The recombinant protein was found in both the soluble and insoluble fractions and displayed bands with the expected size of approximately 72 kDa. During western blotting, the pool of cat serum samples reacted with the selected fractions. The most efficient blocking solution and time were 2% BSA and a 1-hour incubation. The 200 ng/well concentration was found to be optimal during the plate sensitization step; the tests performed with the antigen fractions showed that the insoluble fraction had better reactivity. A 1:200 dilution was selected. The A_{450} values obtained during processing of the 382 feline serum samples were divided into

ranges. Twelve samples (3%) were within the range of 0.0-0.2, 50 samples (13.09%) were within the range > 0.2-0.4, 88 samples (23.04%) were within the range > 0.4-0.6, 102 samples (26.7%) were within the range > 0.6-0.8 and 130 samples (34.03%) were > 0.8 (Figure 1).

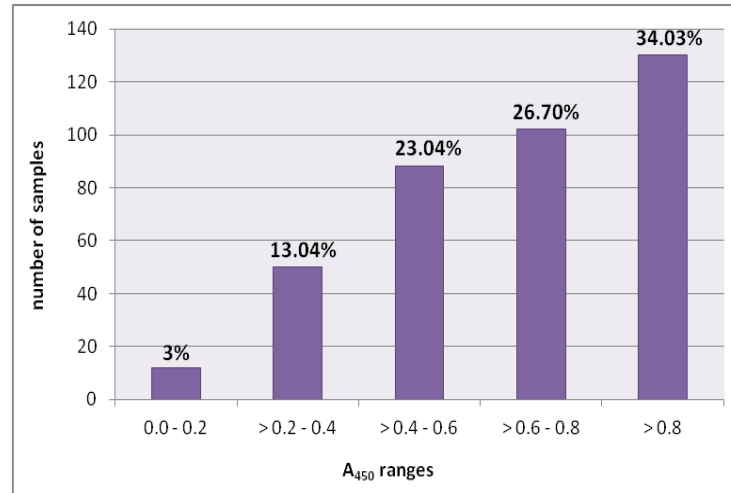


Figure 1. Plot of 382 feline serum samples, divided into the A₄₅₀ ranges 0.0-0.2, > 0.2-0.4, > 0.4-0.6, > 0.6-0.8 and > 0.8.

4. DISCUSSION

The results analysis showed that the standardized ELISA could be used as a quantitative serological technique to detect anti-FCoV antibodies because it showed very good reactivity with the tested cat sera. The sequence obtained from the N protein had 91% nucleotide identity and 89% amino acid identity with sequences that were already known and deposited in GENBANK (to the best of our knowledge, no deposited N protein sequence originated in Brazil). Recombinant gene expression in *E. coli* is complicated by the presence of rare codons (or toxic) used by the recombinant gene that differ from those used by the bacteria. This fact led to the development of algorithms for codon optimization, wherein rare codons present in a target-sequence are replaced with codons preferred by the expression host (Angov, 2011). The indirect ELISA technique showed that the produced FCoV N protein was antigenic, as it showed a capacity to interact with antibodies from a naturally FCoV-infected cat. The use of the N protein as a recombinant antigen is common and, in particular, this protein has been used to diagnose Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), for which the technique is considered to have high specificity and sensitivity. Timani et al., 2004, compared results obtained by

ELISA with a recombinant protein and those obtained by a commercially available diagnostic kit that used a mixture of viral proteins. The authors showed that 81.3% of the sera tested by recombinant N protein ELISA were positive 10 days post-infection, while only 56.3% of the sera tested by the commercial kit were positive during the same time period. With the ELISA results obtained thus far, it was possible to determine only the reactivity of the technique with the recombinant N protein. The ELISA technique exhibited a discriminatory and quantitative ability in cases for which A_{450} values ranging from 0.1 to 1.8 could be discriminated. The results obtained from the processed samples show that more than 50% of the animals exhibited A_{450} values greater than 0.6, indicating that most of the animals displayed anti-FCoV antibody titers (Hartmann et al.; 2003; Simons et al.; 2005, Addie & Jarrett, 2006).

REFERENCES

ADDIE, D.D.; JARRETT, O. Feline Coronavirus Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and the Cat**. 3 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 11, p. 88-102.

ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; RADFORD, A.D.; TRIRY, E.; TRUYEN, U.; HORSINEK, M.C. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 594-604, 2009.

ANGOV, A. Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins. **Biotechnology Journal**. v. 6, p. 650-659, 2011.

BATTILANI, M.; BALBONI, A.; BASSANI, M.; SCAGLIARINI, A.; PALTRINIERI, S.; PROSPERI, S. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. **New Microbiologica**, v. 33, p. 387-392, 2010.

CARATTOLI, A.; DI BONITO, P.; GRASSO, F.; GIORGI, C.; BLASI, F.; NIEDRIG, M.; CASSONE, A. Recombinant Protein-Based ELISA and Immuno-

Cytochemical Assay for the Diagnosis of SARS. **Journal of Medical Virology**. v. 76, p. 137-142, 2005.

HARTMANN, K.; BINDER, C.; HIRSCHBERGER, J.; COLE, D.; REINACHER, M.; SCHROO, S.; FROST, J.; EGBERINK, H.; LUTZ, H.; HERMANN, W. Comparison of Different Tests to Diagnose Feline Infectious Peritonitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine** v. 17, p. 781-790, 2003.

HARTMANN, K. Feline infectious peritonitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, p. 39-79, 2005.

HORA, A.S.; ASANO, K.M.; GUERRA, J.M.; MESQUITA, R.G.; MAIORA, P.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Intrahost Diversity of Feline Coronavirus: A Consensus between the Circulating Virulent / Avirulent Strains and the Internal Mutation Hypotheses? **The Scientific World Journal**. 2013. Available at: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/572325/>>. Accessed on May 30, 2013. doi: 10.1155/2013/572325.

LAI, M. M. C.; HOLMES, K. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.p. 951-969.

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

MYRRHA, L.W.; SILVA, F.M.F.; PETERNELLI, E.F.O.; JUNIOR, A.S.; RESENDE, M.; ALMEIDA, M.R. The paradox of feline coronavirus pathogenesis: a review. **Advances in Virology**. 2011. Available at: <<http://www.hindawi.com/journals/av/2011/109849/>>. Accessed on: Nov 20, 2011. doi: 10.1155/2011/109849.

PRATELLI, A. Comparison of serologic techniques for detection of antibodies against feline coronaviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 20, p. 45-50, 2008.

PRATELLI, A.; YESILBAG, K.; SINISCALCHI, M.; YALÇM, E.; YILMAZ, Z. Prevalence of feline coronavirus antibodies in cats in Bursa province, Turkey, by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 881-884, 2009.

PEDERSEN, N.C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 225-258, 2009.

PEDERSEN, N.C.; LIU, H.; DODD, K.A.; PESAVENTO, P.A. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. **Viruses**. v. 1, p. 166-184, 2009.

OLIVEIRA, F.N.; RAFFI, M.B.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Feline infectious peritonitis: 13 cases. **Ciência Rural**. v. 33, p. 905-911, 2003.

SHARIF, S.; ARSHAD, S.S.; HAIR-BEJO, M.; OMAR, A.R.; ZEENATHUL, N.A.; ALAZAWY, A. Diagnostic Methods for feline coronavirus: A review. **Veterinary Medicine International**. 2010. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2010/809480/> doi: 10.4061/2010/809480

SIMONS, F.A.; VENNEMA, H.; ROFINA, J.E.; POL, J.M.; HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P.J.; EGBERINK, H.F. A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. **Journal of Virology Methods**. v. 124, p. 111-116, 2005.

TIMANI, K.A.; YE, L.; YE, L.; ZHU, Y.; WU, Z.; GONG, Z. Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS. **Journal of Clinical Virology**. v. 30, p. 309-312, 2004.

WOO, P.C.; HUANG, Y.; LAU, S.K.; YUEN, K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**. v. 2, p. 1804-1820, 2010.