

**Núcleo de Avaliação:** Núcleo I

**Área temática:** Ciências Biológicas

**Área do Conhecimento:** Imunologia

## **Desenvolvimento e padronização de imunodiagnóstico para Linfadenite caseosa**

Gabriela Rebouças de Oliveira, Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos, Lara Katelly Dantas da Silva, Lúcia Larissa de Lima Andrade, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

O diagnóstico clínico da Linfadenite caseosa (LC) pode ser dificultado devido a sua forma visceral, na qual os ovinos e caprinos não apresentam sinais visíveis, que permanece sem ser diagnosticada até o abate. Dessa forma, o diagnóstico sorológico se torna o mais adequado para o controle da LC, sendo capaz de detectar a doença nos animais assintomáticos. O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é o principal teste sorológico utilizado, um método econômico e facilmente aplicável na rotina laboratorial. Além disso, a combinação de proteínas recombinantes tem gerado resultados promissores para ovinos, mas pouco tem sido descrito em caprinos. O presente trabalho teve como propósito desenvolver e padronizar um ELISA indireto utilizando as proteínas recombinantes rPLD, rCP01850 e rCP40 para diagnóstico de LC em caprinos. A padronização do ELISA foi realizada através do método *Checkerboard titration* para determinação das concentrações das proteínas, dos soros e do anticorpo conjugado mais adequadas ao ensaio, por meio do uso de soros positivos e de soros negativos. O ELISA indireto foi validado através de 40 soros caprinos negativos provenientes de rebanhos sem sinais de LC e áreas não-endêmicas, e 40 positivos de caprinos com LC clínica, com confirmação microbiológica. Os testes foram realizados em duplicata. Placas de poliestireno de 96 poços, foram sensibilizadas com 100 µL por poço de uma solução contendo 2,0 µg/mL de proteínas recombinantes (na proporção 1:1:1 de rPLD, rCP01850 e rCP40), diluída em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6; as placas foram incubadas a 4 °C durante 16h. O bloqueio foi realizado com PBS-T com 5 % de leite em pó desnatado durante 2h a 37 °C. As amostras de soro foram utilizadas na diluição de 1:50, cada placa contando com um controle positivo, um controle negativo e um branco (apenas PBS-T sem soro animal); as placas foram incubadas por 1h a 37 °C. Como anticorpo secundário usou-se o conjugado IgG anti-cabra marcado com peroxidase, na diluição de 1:40.000, e incubou-se durante 45 minutos a 37 °C. Para revelação, usou-se o tampão citrato-fosfato pH 4,0, OPD e peróxido de hidrogênio; após adição das soluções de revelação, as placas foram incubadas em temperatura ambiente e em local escuro por 15 minutos. As reações foram paradas com solução de ácido sulfúrico a 5 %, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. Os resultados das absorbâncias

---

foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística, o software SPSS v. 12.0 (IBM) foi usado para gerar a curva ROC e estabelecer os valores de especificidade, sensibilidade e acurácia. A partir da curva ROC gerada, estabeleceu-se como ponto de corte o valor de 0,26975, tendo em vista que este valor gerou os valores máximos de 90 % sensibilidade e 90 % de especificidade, além de uma acurácia global de 96,6 %. Como conclusão, a combinação das proteínas rPLD, rCP40 e rCP01850, usada em ELISA indireto, é uma estratégia promissora para o imunodiagnóstico de LC em rebanhos caprinos.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caprino, ELISA indireto, proteína recombinante.

**Agência financiadora:** PIBITI/UFERSA

**Campus:** Mossoró

---