



XXX Seminário de

**INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**DA UFERSA**

09 a 12 de dezembro de 2024

**Núcleo de Avaliação:** Núcleo I

**Área temática:** Ciências Biológicas

**Área do Conhecimento:** Imunologia

## **Combinação de proteínas recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na padronização de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa**

Lara Katelly Dantas da Silva, Mônica Ellen da Costa Soares, Thiago Vinicius Santos e Alves, Lenise Maria Parente Mota, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

Grande parte dos ovinos e caprinos infectados pela *Corynebacterium pseudotuberculosis* desenvolvem a infecção assintomática, o que dificulta o diagnóstico. Nesse sentido o teste de ELISA indireto apresenta-se como uma alternativa confiável no diagnóstico da linfadenite caseosa (LC). Alguns estudos têm demonstrado que a associação de proteínas recombinantes na etapa de sensibilização do ELISA indireto podem resultar em testes mais acurados que o uso de proteínas isoladas, porém a maioria tem focado na espécie ovina, e pouco tem se estudado em relação aos caprinos. Este trabalho objetivou padronizar e validar um ELISA indireto para o diagnóstico da LC em caprinos combinando proteínas recombinantes rPLD e rCP01850 de *C. pseudotuberculosis*. A padronização do ELISA foi efetuada através do método *checkerboard titration*, por meio do uso de um pool de 5 soros provenientes de animais positivos (controle positivo) e de um pool de 5 soros provenientes de animais negativos (controle negativo). Todas as amostras foram testadas em duplicata. Após a padronização, o teste foi validado através da testagem de 80 soros, sendo 40 negativos de rebanhos sem sinais de LC e áreas não-endêmicas, e 40 positivos de caprinos com LC clínica, com confirmação por testes microbiológicos. Para isto, placas de poliestireno de 96 poços, foram sensibilizadas com 100µL por poço contendo 1,0 µg/mL de proteína recombinante (na proporção 1:1 de rPLD e rCP01850), diluída em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6, e incubado a 4°C durante 16h. A placa então foi lavada três vezes com PBS-T (0,05%), e foi utilizado PBS-T com 5% de leite em pó desnatado durante 2h a 37°C, para a realização do bloqueio. A placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T (0,05%), e então foi aplicado as amostras de soro na diluição de 1:50, em duplicata, cada placa contando com um controle positivo, um controle negativo e um branco (apenas PBS-T sem soro animal), e incubado por 1h a 37°C. Então, após mais três lavagens, foi adicionado o conjugado IgG anti-cabra marcado com peroxidase, na diluição de 1:5000, e incubado durante 45 minutos a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada cinco vezes, e foi aplicada a solução de revelação contendo tampão citrato-fosfato pH 4,0, OPD e peróxido de hidrogênio, e deixado à temperatura ambiente e em local escuro por 15 minutos. As reações foram paradas com solução de ácido sulfúrico à 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 o ponto de corte que determinasse valores máximos de especificidade, sensibilidade e acurácia. A partir da curva ROC gerada, observou-se que o ponto de corte de 0,160 gerou valores de 90% de sensibilidade e de especificidade, com área sob a curva de 0,974 (representando uma acurácia de 97,4%). Em suma, o ELISA indireto com rPLD e rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* apresentou-se promissor para o diagnóstico sorológico da LC em caprinos.

**Palavras-chave:** Caprino, rPLD, rCP01850, imunoenensaio.

**Agência financiadora:** PIBIC/CNPq

**Campus:** Mossoró

---