

LUIZ COSME DA SILVA JÚNIOR

**ELISA PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE AUJESZKY EMPREGANDO gE
RECOMBINANTE ESTABILIZADA COMO PROTEÍNA FUSIONADA À
TIORREDOXINA**

RECIFE

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

LUIZ COSME DA SILVA JÚNIOR

**ELISA PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE AUJESZKY EMPREGANDO gE
RECOMBINANTE ESTABILIZADA COMO PROTEÍNA FUSIONADA À
TIORREDOXINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

Co-orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Dr. André Luiz Santos de Jesus

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

S856e Silva Júnior, Luiz Cosme da
Elisa para diagnóstico da doença de Aujeszky empregando gE
recombinante estabilizada como proteína fusionada à tiorredoxina /
Luiz Cosme da Silva Júnior. – 2017.
69 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.
Coorientadores: Antonio Carlos de Freitas e André Luiz Santos
de Jesus.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife,
BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Antígeno recombinante 2. Estabilidade proteica
3. Tiorredoxina 4. DIVA 5. imunodiagnóstico I. Castro, Roberto
Soares de, orient. II. Freitas, Antonio Carlos de, coorient. III. Jesus,
André Luiz Santos de, coorient. IV. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ELISA PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE AUJESZKY EMPREGANDO gE
RECOMBINANTE ESTABILIZADA COMO PROTEÍNA FUSIONADA À
TIORREDOXINA**

Tese de Doutorado elaborada por

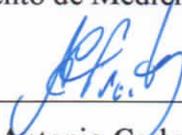
LUIZ COSME DA SILVA JÚNIOR

Aprovada em 30/08/2017

BANCA EXAMINADORA



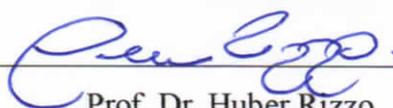
Prof. Dr. Roberto Soares de Castro
Orientador - Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



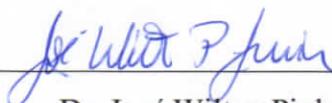
Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Co-orientador - Departamento de Genética da UFPE



Prof.^a Dra. Ana Lisa do Vale Gomes
Núcleo de Enfermagem - UFPE



Prof. Dr. Huber Rizzo
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força, vontade e ânimo que me fizeram alcançar mais esta conquista.

A Jesus por me provar que qualquer coisa é supérflua diante da Salvação concedida por Ele, e que amar ao próximo é muito gratificante e é a essência da vida.

Ao Espírito Santo por Sua amizade inestimável.

A meus pais Luís e Maria e a minha irmã Elizabete, que são a base que me dá segurança e confiança para focar em meus objetivos e alcançá-los.

A minha esposa Giselle (Continuo...), pelo apoio, carinho e compreensão. Tem que ser muito especial para suportar estar ao meu lado.

A minha sobrinha Izabella, com quem vou passear muito para compensar o período que estive distante investido nos trabalhos do doutorado.

Ao Professor Roberto Soares de Castro, por me ensinar que ser um doutor é muito pouco diante das possibilidades. Como também pela confiança, confiança e inspiração que fazem valer a pena amar minha profissão e não desistir dos meus objetivos.

Ao Professor Antônio Carlos de Freitas e sua equipe, pela colaboração com este trabalho.

A prof. Ana Lisa do Vale Gomes e ao Dr. André Luiz, pela fundamental colaboração e inquestionáveis amizades.

A Karin Fontes, que se tornou alguém de inestimável importância pessoal e profissional.

Ao PPGCV pelo desempenho e excelência de seu trabalho.

A FACEPE e FINEP, pelo fundamental apoio financeiro.

Aos meus grandes amigos do LaViAn, Sérgio e Inês, que são meu escape nos momentos escuros.

A todos os meus amigos que, forçadamente, abdicaram de momentos de descontração comigo para me apoiarem com palavras de conforto e muita compreensão.

“Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde e força para qualquer sociedade.”

Albert Einstein

RESUMO

O impacto econômico causado pela Doença de Aujeszky (DA) tem diminuído com uso de vacinas deletadas para o gene gE do Vírus da DA e testes diagnósticos para detecção de anticorpos específicos para a proteína correspondente ao gene deletado, para diferenciação dos animais infectados dos vacinados - DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated individuals). O objetivo com este trabalho foi clonar e expressar o gene referente a porção extramembranar da glicoproteína gE do vírus da DA em sistema de expressão *E. coli* utilizando gene sintético com códons otimizados e proteína fusionada a tiorredoxina (Trx), e avaliar seu potencial uso em ELISA. Após a clonagem, expressão e a identificação da proteína gE recombinante (gErec*Trx) em *Western blotting* com anticorpo anti-His, a gErec*Trx (aproximadamente 60 kDa) foi usada como antígeno em ELISA (ELISAgErec) utilizando Proteína G peroxidase como conjugado. Amostras previamente testadas em virusneutralização (VN) e em ELISA comercial foram testadas no ELISAgErec, e o ponto de corte ($>0,13$) foi definido por análise da curva ROC. Foram utilizados 599 soros de suínos, sendo 208 positivos virusneutralização (VN) e 391 negativos em ELISA comercial para detecção de anticorpos anti-gE do vírus da DA, sendo 300 oriundas de Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas (GRSCs) e 91 de propriedades tecnificadas do estado de Pernambuco. O ELISAgErec apresentou sensibilidade de 97,6% e especificidade de 96,4%. Para avaliar a sensibilidade analítica e o limite de detecção foi testado o soro internacional de referência para a DA, e para avaliação da especificidade analítica foram testados soros de suínos Livre de Patógenos Específicos (SPF) vacinados com as principais vacinas usadas em suínos. O ELISAgEr apresentou maior sensibilidade que o ELISA comercial demonstrando assim sua capacidade de distinguir animais sadios e vacinados dos animais infectados. Além de apresentar boa solubilidade a gErec se manteve imunorreativa no mesmo título no ELISAgErec após vários meses estocada a 4 °C, e mesmo após estresse térmico a 70 °C apresentou mesmos resultados.

Palavras-chave: antígeno recombinante, estabilidade proteica, Tiorredoxina, DIVA, imonodiagnóstico.

ABSTRACT

The economic impact caused by Aujeszky's disease (AD) has decreased with the use of vaccines deleted for the gE gene of the AD Virus and diagnostic tests for the detection of antibodies specific to the protein corresponding to the deleted gene for differentiation of infected animals from the vaccinated - DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated individuals). The goal of this work was to clone and express the gene related to the extramembrane portion of the gE glycoprotein of the DA virus in *E. coli* expression system using synthetic gene with optimized codons and thioredoxin fused protein (Trx), and to evaluate its potential use in ELISA. After cloning, expression and identification of recombinant gE protein (gErec*Trx) in Western blotting with anti-His antibody, gErec*Trx (approximately 60 kDa) was used as antigen in ELISA (ELISAgErec) using Protein G peroxidase as conjugate. Samples previously tested in virus neutralization (VN) and in commercial ELISA were tested in ELISAgErec, and the cutoff point (> 0.13) was defined by ROC curve analysis. A total of 599 sera from pigs were used, of which 208 were positive VN and 391 negative in commercial ELISA for the detection of anti-gE antibodies from the DA virus, of which 300 originated from Certified Porcine Breeding Farms (GRSCs) and 91 from Technological properties of the State of Pernambuco. ELISAgErec presented sensitivity of 97.6% and specificity of 96.4%. To evaluate the analytical sensitivity and limit of detection, the international reference serum for AD was used, and for analysis of the analytical specificity were tested sera from pigs Pathogen-Specific Free (SPF) vaccinated with the main vaccines used in pigs. ELISAgEr showed greater sensitivity than the commercial ELISA thus demonstrating its ability to distinguish healthy and vaccinated animals from infected animals. In addition, to showing good solubility, gErec remained immunoreactive in the same titre in ELISAgErec after several months stored at 4 °C, and even after thermal stress at 70 °C it presented the same results.

Key words: Recombinant antigen, protein stability, Thioredoxin, DIVA, immunodiagnosis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1** Partícula viral dos Herpesvírus.
- FIGURA 2** Possíveis vias de transporte da partícula viral em gânglio do SNC.
- FIGURA 3** Diferente resposta imunológica obtida com estratégias de vacinação.
- FIGURA 4** Mutações presentes no genoma da cepa Bartha.
- FIGURA 5** Esquema didático do SHV-1 demonstrando suas glicoproteínas.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DO ARTIGO

- FIGURA 1** Comparação das sequências nucleotídicas nativa e códon otimizada.
- FIGURA 2** Eletroforese do produto da digestão do DNA plasmidial dos clones.
- FIGURA 3** Gel de SDS-PAGE com os produtos de quatro clones com a gErec.
- FIGURA 4** Western Blot com anticorpo anti-His identificando a gErec.
- FIGURA 5** Curva ROC do ELISAgErec.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

- TABELA 1** Características do sistema de expressão por *E. coli*.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DO ARTIGO

- TABELA 1.** Avaliação das características diagnósticas do ELISAgErec para diagnóstico da Doença de Aujeszky em suínos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	Doença de Aujeszky
SHV-1	Herpesvírus Suino 1
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
SUASA	Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
GRSCs	Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas
EUA	Estados Unidos da América
VDA	Vírus da Doença de Aujeszky
PRV	<i>Pseudorabies virus</i> – Vírus da Pseudorraiva
UL	<i>Unique long</i>
US	<i>Unique short</i>
kbp	Kilo pares de bases
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
gG	Glicoproteína G
gH	Glicoproteína H
gI	Glicoproteína I
gK	Glicoproteína K
gL	Glicoproteína L
gK	Glicoproteína K
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNC	Sistema Nervoso Central
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
mAbs	Monoclonal Antibodies (Anticorpos monoclonais)
MHC-1	<i>Major Histocompatibility Complex - 1</i> – Complexo Maior de Histocompatibilidade – 1
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
TK	Timidina Kinase
PCR	polymerase chain reaction – Reação em Cadeia da Polimerase

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DIVA	<i>Differentiating Infected from Vaccinated individuals</i> (Diferenciação de indivíduos infectados dos vacinados)
BL-21	Linhagem de célula de <i>Escherichia coli</i> livre de plasmídeo utilizada para produção de proteínas
gErec	gE recombinante
Trx	Tiorredoxina
GErec*Trx	gE recombinante fusionada a Tiorredoxina
VN	Virusneutralização
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodáton
PAGE	<i>Polyacrimilamide Gel Eletrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
AMP	Ampicilina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
IPTG	IsoPropil-BETA-DTioGalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani medium (meio Luria Bertani)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampão salina fosfato)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	12
2 – REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1- Suinocultura	14
2.2- Doença de Aujeszky	15
2.2.1- Breve Histórico	15
2.2.2- SHV-1	16
2.2.3- Hospedeiros e Transmissão	17
2.2.4- Patogenia e Sinais Clínicos	19
2.2.5- Diagnóstico	21
2.2.6- Controle	26
2.2.7- Vacinas	29
2.3- Sistemas de Expressão	34
2.4- <i>Codon usage</i>	37
2.5- Proteína de fusão	37
3- REFERÊNCIAS	39
4 - ARTIGO	49
Resumo	50
Abstract	51
1- Introdução	52
2- Material e métodos	53
2.1- Construção da sequência do gene gE sintético	53
2.2- Transformação da <i>E. coli</i> e Produção da proteína	54
2.3- Imunodeteção da gErec	54
2.4- ELISAgErec	55
2.5- Termoestabilidade da gErec	56
3- Resultados	57
4- Discussão	61
5- Conclusão	65
Agradecimentos	65
Referências	66

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Aujeszky (DA), causada pelo Herpesvírus Suíno 1 (SHV1), é uma virose que causa consideráveis perdas econômicas à indústria suinícola mundial. A DA é de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012), o que gera a possibilidade de criação de barreiras sanitárias para o comércio internacional.

O SHV1 é um vírus envelopado que apresenta importantes glicoproteínas em sua superfície. Algumas estão envolvidas na interação vírus-hospedeiro e são imprescindíveis à replicação viral (gB, gH, gD, gL e gK), outras (gC, gE, gG, gI e gM) não são essenciais (NAUWYNCK, 1997). Com base nisto, foram desenvolvidas vacinas atenuadas com cepas cujos genes gE, gC ou gG foram deletados (FREULING et al 2017), o que permitiu o uso de teste sorológico para detecção de anticorpos específicos para a proteína correspondente ao gene deletado, para diferenciação dos animais infectados dos vacinados - DIVA (Differentiating Infected from vaccinated individuals), termo proposto por Van Oirschot (1999).

O controle da DA tem sido conduzido com o uso de vacinas deletadas para os genes gE, gC ou gG, monitoramento dos rebanhos por testes DIVA e eliminação dos animais positivos e, na fase final de erradicação, dos rebanhos positivos (CIACCI-ZANELLA e FLORES, 1995). Apesar de não impedir a infecção nem o estabelecimento do estado de latência, a vacinação diminui consideravelmente os sinais clínicos, a mortalidade e a transmissão do vírus no rebanho (VAN OIRSCHOT, 1999; FREULING et al 2017).

As cepas vacinais mais utilizadas para a DA são atenuadas por deleção do gene gE do SHV1 (FREULING et al., 2017). A proteína gE é produzida em altos níveis na célula infectada, sendo fundamental para a disseminação e virulência do SHV1 e é a proteína mais importante na produção da resposta humoral em suínos naturalmente infectados. Além disso, a gE é altamente conservada entre as diferentes amostras virais de campo, inclusive as brasileiras (MENGELING et al., 1997; FONSECA JÚNIOR, 2010). Os ELISA DIVA para DA foram desenvolvidos inicialmente com anticorpos monoclonais (mAbs) contra epítomos de gE, empregados em ensaios competitivos (VAN OIRSCHOT, 1986; VAN OIRSCHOT et al., 1988) e, mais recentemente, com o uso de gE recombinantes produzida em baculovírus (KIMMAN et al., 1996; SERENA et al., 2011), *Escherichia coli* (MORENKOV, FODOR e FODOR, 1999) e *Pichia pastoris* (AO et al., 2003). Apesar de ser o ELISA com mAbs o mais empregado como DIVA, a produção de mAbs é dispendiosa, emprega cultivo celular ou animais de laboratório

(DEB et al., 2013) e, no caso específico da gE, pode haver o risco de variação antigênica das cepas de campo exatamente nos epítomos para os quais os mAbs foram produzidos, conforme alertado no trabalho original de desenvolvimento (VAN OIRSCHOT et al., 1986).

A proteína gE do SHV1 é glicosilada. Assim, através da engenharia genética, teoricamente, tem a indicação de ser produzida usando-se sistemas eucariotos, que realizam modificações pós-traducionais, como a glicosilação. Os ELISAs com gE produzidas em baculovírus e *P. pastoris* apresentaram baixas sensibilidade e especificidade (AO et al., 2003; SERENA et al., 2011). Por outro lado, o sistema de expressão *E. coli*, principal escolha da indústria mundial, tem facilidade de manipulação, relativamente baixo custo de cultivo e produção de alta qualidade e quantidade (DEMAIN e VAISHNAV, 2009; JIA e JEON, 2016). Diferentes porções da gE já foram clonadas em *E. coli* e utilizadas em ELISAs, que apresentaram resultados promissores (NI et al., 2004; YONG et al., 2005), apesar das limitações desse sistema em realizar pontes de sulfeto, dobramentos estruturais, glicosilação e outras modificações pós-traducionais que garantem a adequada formação e funcionamento da proteína heteróloga (DALY e HEARN, 2005).

As tecnologias utilizadas na clonagem de e expressão de genes de proteínas heterólogas têm avançado significativamente com a possibilidade de análises in silico e melhor desenho de estratégias. O uso de gene sintético, com códons otimizados para o hospedeiro, tem se mostrado eficiente para melhorar a qualidade da expressão (GUSTAFSSON et al., 2004), com incremento, em *E. coli*, de cinquenta a cem vezes o nível de produção da proteína recombinante (RANGWALA et al., 1992). Adicionalmente, várias proteínas de fusão têm sido usadas como estratégias para conferir atribuições à proteína recombinante que permitem o aumento da produção, solubilidade, estabilidade, purificação por afinidade, imunodeteção e estabilidade conformacional (KOSOBOKOVA et al., 2016). Genes fusionados ao gene da tioredoxina quando induzidos produzem, em elevados níveis, a proteína alvo em forma solúvel e bioreativa, com alta estabilidade térmica, o que tem permitido sua purificação com protocolos de aquecimento e centrifugação (LAVALLIE et al., 2000; MARCO et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um ELISA DIVA para diagnóstico da DA em suínos, empregando gE recombinante, produzida em *E. coli*, fusionada à tioredoxina com elevada solubilidade, estabilidade e imunorreatividade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suinocultura

A suinocultura no mundo está em expansão, e o consumo de carne suína e seus derivados têm aumentado conforme também muda o padrão de vida nos países em desenvolvimento. Na presente década esse mercado já possui o dobro de animais que continha na década de 70, como produção e consumo globais (ABIPECS, 2013, ABPA, 2017).

A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo, oferecendo vários benefícios à saúde. Além de fonte proteica é rica em vitaminas e minerais que garantem uma alimentação saudável e balanceada. A gordura da carne suína encontra-se, em grande parte, localizada abaixo da pele e apenas 20 a 22% entremeada no músculo. Esta característica permite ao consumidor maior controle na ingestão de gordura, pois possibilita a remoção de grande parte do tecido adiposo e o preparo de pratos menos calóricos (SARCINELLI, VENTURINI e SILVA, 2007; ABIPECS, 2013).

A restrição médica à utilização sem controle da gordura animal na dieta humana e a substituição desta pela gordura vegetal, provocou mudanças no perfil da produção de suínos no mundo. Nos últimos anos houve a progressiva substituição do suíno tipo banha (grande produtor de gordura) pelo suíno tipo carne (menor produção de gordura), onde neste houve a redução de 31% da gordura, 10% do colesterol e 14% das calorias, atendendo assim as novas exigências do mercado (BRASIL, 2013).

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína, representando quase 10% do volume exportado no mundo, ficando atrás nas exportações apenas dos Estados Unidos, União Europeia e Canadá. Em 2014 produziu 3.471,7 mil toneladas desta carne, sendo 14,2% (505 mil toneladas) dessa produção destinada exportação, chegando a lucrar mais de US\$ 1,3 bilhão. Em 2015 houve abate recorde de suínos, com aumento de 5,7% em comparação ao ano anterior, e esse crescimento observado no setor está estimulando o aumento dos investimentos na suinocultura industrial (ABPA, 2017).

O grande fator que implica no volume de exportação de carne suína e influencia no surgimento de barreiras econômicas no Brasil é a situação sanitária atual do país. Países como Coreia do Sul, Índia, África do Sul, México e alguns outros, que são potenciais consumidores deste produto, não importam a carne brasileira principalmente pela situação sanitária dos nossos rebanhos em relação à Febre Aftosa, onde o Brasil é considerado livre apenas no Estado de Santa Catarina, e nos demais Estados é livre com vacinação (ABIPECS, 2013).

O Brasil é um grande consumidor da carne suína, onde cerca de 85% da produção é consumida pelo mercado interno. A região sul é a maior produtora, consumidora e exportadora de carne suína e seus produtos (ABIPECS, 2013). A produção de suíno para distribuição e comercialização só pode ser realizada pelas Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas (GRSC), e a certificação dessas granjas é baseada na comprovação da ausência de doenças (Peste Suína Clássica, Doença de Aujeszky (DA), Tuberculose, Brucelose, Leptospirose e Sarna) onde o rebanho é submetido a testes laboratoriais semestrais (MAPA, 2017).

São diversos os agentes patogênicos que acometem suídeos. Podem ser bactérias, parasitos, protozoários ou vírus. Brucelose, Leptospirose, Tuberculose, Salmonelose, Meningite Estreptocócica, Colibacilose, Clostridiose, Rinite Atrófica, Doença de Glässer, Cistecercose, Toxoplasmose, Coccidiose, Sarna, Peste Suína Clássica, Parvovirose Suína, Circovirose Suína, Rotavirose Suína e DA são exemplos de enfermidades frequentes em rebanhos suínos. Dentre essas enfermidades a Peste Suína Clássica e a DA possuem programas próprios de fiscalização no Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), para controle e erradicação das mesmas (MAPA, 2017).

2.2 Doença de Aujeszky

2.2.1 Breve Histórico

A DA foi descoberta por Aladar Aujeszky, médico veterinário húngaro que identificou que se tratava de uma doença viral e conseguiu reproduzir a enfermidade em cão e em gato no ano de 1902 (AUJESZKY, 1902. *apud* LEE e WILSON, 1979). A doença foi observada inicialmente em bovino e no cão, e mais tarde em felino e em outras espécies. Nos EUA a DA foi identificada como a doença "mad-itch" em 1931, só depois que foi confirmada como sendo a DA, e ficou conhecida como Pseudorraiva após a identificação do agente e pela semelhança clínica apresentada com a raiva (LEE e WILSON, 1979).

Antes da década de 60 a doença tem sido importante apenas em alguns países da Europa. Mas, após a década de 70, a DA já estava causando prejuízos na suinocultura por todo o mundo, o que foi impulsionado pelas mudanças na criação e forçou a indústria suinícola a buscar soluções para esse problema (PEJSAK e TRUSZCZYNSKI, 2006). O primeiro caso observado da DA no Brasil ocorreu em São Paulo em 1912, e a doença foi registrada em vários outros Estados da federação. No final da década de 40 o país ficou conhecido como o maior foco da DA no mundo, onde ocorreram 111 surtos (LEE e WILSON, 1979).

A DA está na lista de infecções e infestações da OIE que exige notificação do surgimento de casos e surtos (OIE, 2012), e é responsável por consideráveis perdas econômicas diretas e indiretas à indústria suinícola mundial, decorrentes do impacto na produção, havendo a eliminação dos animais infectados dos rebanhos e restrição ao comércio internacional de seus produtos (VERPOEST et al., 2017).

Surto da DA no Rio Grande do Sul causou prejuízos enormes às criações de suínos. A presença do vírus no rebanho levou a alta taxa de mortalidade em leitões pré-desmame e taxa de abortamento de 5% entre as matrizes. Com o objetivo de controlar e erradicar o vírus, levantamento sorológico foi realizado no rebanho foco e em rebanhos vizinhos, resultando na identificação de 82 propriedades com a presença do vírus e mais de 35 mil animais infectados. Os rebanhos positivos foram eliminados, respeitando o vazio sanitário de 28 dias antes do repovoamento, causando prejuízos aos suinocultores (GROFF et al., 2005).

2.2.2 SHV-1

O agente causador da DA é o SHV-1, também conhecido como Vírus da Doença de Aujeszky (VDA) ou Vírus da Pseudorraiva (*Pseudorabies virus* – PrV). O SHV-1 é um DNA vírus pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. Baseado na similaridade genômica, quatro gêneros compõem os Alphaherpesvírus: *Varicella-Zoster virus*, *Herpes Simplex virus* tipo 1, *Infectious Laryngotracheitis virus* e Vírus da Doença de Marek (METTENLEITER, 1996; MORENKOV et al., 1997; ICTV, 2017).

O SHV-1 possui tamanho entre 200 e 250nm, é composto por capsídeo icosaédrico simétrico formado por nucleoproteínas; tegumento, que é uma estrutura proteínica amorfa, envolta por uma bicamada lipídica, o envelope; seu material genético é composto por uma fita dupla de DNA (Fig. 1). O genoma é formado por duas regiões, um segmento único longo (*Unique long* – UL) e um segmento único curto (*Unique short* - Us), que juntas contêm 70 genes, com tamanho de aproximadamente 150 kbp (METTENLEITER, 1996; KLUPP et al., 2004; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005).

A arquitetura do capsídeo dos Alphaherpesvírus tem sido estudada inicialmente no HSV1. Contudo, a semelhança morfológica e homologia dos componentes do capsídeo indicam que eles compartilham recursos comuns (PEJSAK e TRUSZCZYNSKI, 2006).

A membrana viral possui onze proteínas que compõem o envelope. Elas possuem a adição de cadeias de carboidratos, por isso, são denominadas glicoproteínas, e estão envolvidas em importantes interações vírus-hospedeiro, são as gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM e gN (METTENLEITER, 2000). É imprescindível a presença de algumas (gB, gH, gD, gL e gK) para que ocorra a replicação viral, já outras gC, gE, gG, gI e gM não são consideradas essenciais para a replicação do vírus, e seus respectivos genes podem ser deletados para formar novas cepas não virulentas, possíveis de serem usadas como vacinas (METTENLEITER, 1996; MENGELING et al., 1997; MORENKOV et al., 1997; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005).

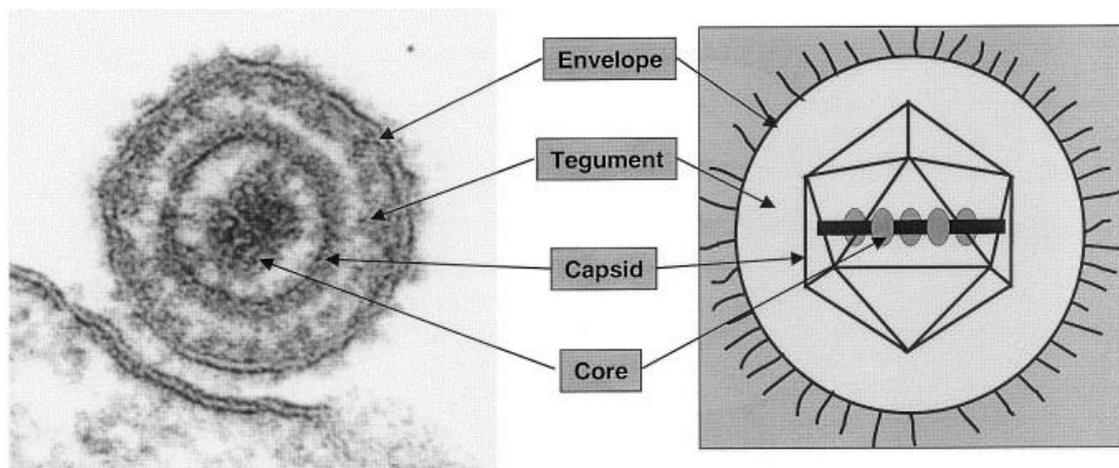


Figura 1. Partícula viral dos Herpesvírus com quatro estruturas morfológicamente diferenciáveis: O núcleo interno contendo o genoma de DNA linear de cadeia dupla é localizado no interior de um capsídeo icosaédrico, que é rodeado por uma camada de mais de quinze proteínas diferentes, que constituem o tegumento. A partícula está envolta por um envelope, camada lipídica contendo proteínas, principalmente as glicosiladas (METTENLEITER, 2003).

2.2.3 Hospedeiros e Transmissão

Os Alphaherpesvirus são caracterizados por rápido crescimento lítico em cultura de células, neurotropismo, permanência em estado de latência nos neurônios e por possuírem ampla gama de hospedeiros, fatores que são pronunciados no SHV-1 (PEJSAK e TRUSZCZYNSKI, 2006).

O vírus da DA acomete várias espécies de mamíferos, em sua maioria a infecção apresenta taxa de mortalidade de 100%, inclusive nos suínos jovens. Apesar dos primatas não humanos, do homem, e animais de sangue frio serem refratários, em casos particulares a infecção pode ocorrer em humanos, embora os riscos permaneçam baixos (MRAVAK et al.,

1987). Já os equinos e os primatas apresentam relativa resistência à infecção pelo SHV-1 (METTENLEITER, LUKÀCS e RIZHA, 1985; METTENLEITER, 1996; PUSIC et al., 2011; WOZNIAKOWKI e SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015).

A eliminação do vírus acontece principalmente por secreção nasal, e a transmissão ocorre pelo contato direto entre animais infectados e sadios. Por isto, a grande densidade populacional nos rebanhos suínos facilita a disseminação do vírus, o que é mais propício acontecer nas granjas de intensa produção (ANDERSSON et al., 1997). O manejo natural (extensivo) favorece a prevenção da transmissão do SHV-1 (MILICEVIC et al., 2016).

A propagação entre os rebanhos ocorre pela introdução de animais infectados pelo SHV-1 no plantel (GROFF et al., 2005). Na aquisição de animais, principalmente matrizes e reprodutores, deve-se preconizar a realização de teste diagnóstico e respeitar o período de quarentena, mesmo que sejam oriundos de GRSCs (OIE, 2012). A introdução de um reprodutor infectado no rebanho possibilita a rápida disseminação do vírus por contato entre o reprodutor e as matrizes, e das matrizes para a leitegada (MORES et al., 2007; PUSIC et al., 2011).

A alimentação de porcos com restos alimentares humanos facilita a disseminação do SHV-1 no rebanho e entre rebanhos. Já os carnívoros têm como principal forma de infecção a ingestão de carne ou ossos de suínos mortos infectados pelo vírus DA (CHRISTENSEN et al., 1992; PUSIC et al., 2011).

A capacidade que o vírus possui de infectar várias espécies animais facilita sua manutenção na natureza. Caninos, felinos, bovinos, ovinos, caprinos, macacos e roedores, em contato com suínos infectados podem se infectar e transmitir o vírus para áreas livres da doença (PUSIC et al., 2011).

Em alguns países o SHV-1 foi erradicado das criações de suínos domésticos. Contudo, os suínos selvagens continuaram sendo uma ameaça constante para a produção suinícola, por serem reservatórios do vírus e haver a possibilidade da infecção latente (METTENLEITER, 2000; MULLER, 2011; WOZNIAKOWKI e SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015; MILICEVIC et al., 2016).

Suínos selvagens não apresentam o hábito de terem contato constante, o que dificulta a transmissão do vírus. Contudo, no período reprodutivo acontece a migração de animais para acasalamento o que torna a transmissão venérea a principal via de transmissão nesse grupo de animais, mantendo a disseminação e permanência do vírus (SMITH, 2012; MILICEVIC et al., 2016).

Além disso, o vírus pode ser deslocado por grandes distâncias por vetores mecânicos, animais domésticos e selvagens, e na forma de aerossóis, podendo chegar a rebanhos próximos

e ampliar a zona afetada pela infecção. Morcegos hematófagos podem transportar o sangue infectado e inocular em outros animais através da mordida (PUSIC et al., 2011). Animais silvestres podem ser responsáveis pela transmissão do vírus entre rebanhos. Mas, juntamente com os vetores mecânicos e transmissão por aerossóis, são de pouca importância epidemiológica em surtos da DA (GROFF et al., 2005; WOZNIAKOWKI e SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015).

2.2.4 Patogenia e Sinais Clínicos

Para que ocorra a infecção na célula é fundamental a interação de glicoproteínas do envelope viral com a membrana celular, onde ocorre o reconhecimento da célula alvo (gC), ancoramento do vírus (gD) e fusão dessas duas membranas (gB, gH/gL e gD) (PEJSAK e TRUSZCZYNSKI, 2006). Estas últimas quatro proteínas apresentam seus respectivos genes bem conservados nos vírus da família dos herpesvírus. Após a entrada do vírus na célula o capsídeo é orientado para o núcleo e libera o DNA viral através do poro nuclear (METTENLEITER, 2000).

O SHV-1 é um vírus multitrópico, porém, o principal sítio de latência são os neurônios. Na infecção do Sistema Nervoso Periférico (SNP) o vírus migra célula-célula através das sinapses, até o Sistema Nervoso Central (SNC) causando encefalite letal. A atividade deubiquitinase da proteína pUL36 garante ao vírus capacidade de quebrar a barreira neuronal na sinapse do neurônio epitelial, permitindo sua transmissão pelo sistema nervoso e garantido a replicação do vírus (YORK, 1996; SMITH, 2012).

No neurônio infectado o vírus pode apresentar três vias de transporte: uma anterógrada para a periferia, na qual ele pode retornar ao epitélio; uma anterógrada para o SNC; e uma via retrógrada, onde retorna do epitélio para o sítio de latência (Fig. 2) (SMITH, 2012).

Latência é o período em que o DNA persiste, mas não são produzidas novas partículas virais. Os principais sítios de latência do SHV-1 estão do gânglio trigeminal, no bulbo olfatório e nas tonsilas, e a presença de um neurônio infectado em latência limita uma nova infecção. Cepa atenuada usada na vacinação infecta o neurônio, que resiste à infecção com cepas selvagens (METTENLEITER, 2000).

A virulência do SHV-1 é determinada por glicoproteínas de membrana, enzimas virais e proteínas não essenciais do capsídeo. Quando essas enzimas são inativadas e/ou os genes dessas glicoproteínas não são expressos em células infectadas, o vírus se torna atenuado perdendo o poder de provocar a doença (PEJSAK e TRUSZCZYNSKI, 2006).

O vírus da DA codifica várias proteínas com atividade enzimática, sendo a mais notável a timidina quinase. Ela atua na neurovirulência mas não é essencial ao vírus, o que possibilita a sua remoção em cepas não virulentas que podem ser usadas como vacinas (VAN OIRSCHOT, 1990; METTENLEITER, 2000).

O SHV-1 tem a capacidade de infectar células nervosas vizinhas à célula infectada inicialmente, garantindo assim a disseminação lateral do vírus. Além do sistema epitelial e SNC o SHV-1 também infecta o sistema respiratório, e outras células como os monócitos, assim, através da viremia pode ser disseminado por via transplacentária e também infectar órgãos como o baço, fígado, testículo e medula óssea, podendo levar o animal a morte antes mesmo do vírus chegar ao cérebro (SMITH, 2012).

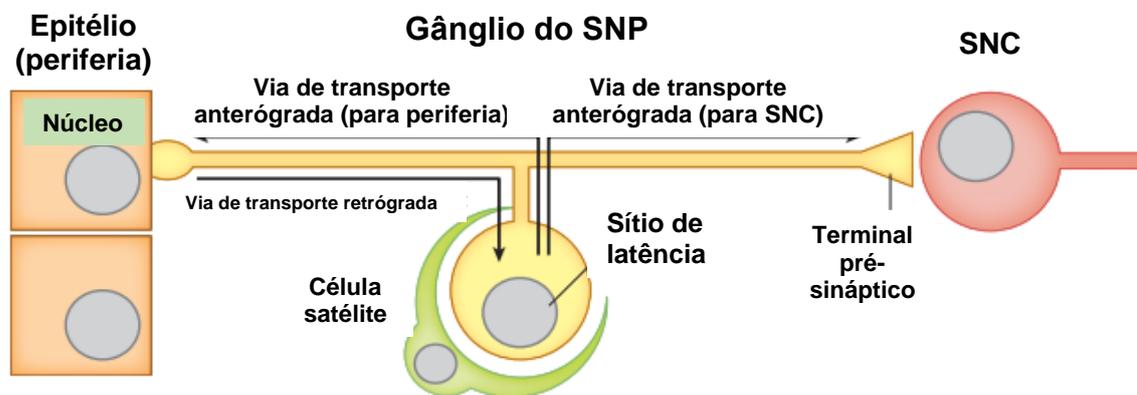


Figura 2. Possíveis vias de transporte da partícula viral em gânglio do SNC (Adaptado, SMITH, 2012).

O período de incubação do SHV-1 é de um a onze dias, sendo mais frequentemente entre três e seis dias, e o prurido intenso é o sinal clínico presente na maioria das espécies acometidas, podendo ocorrer no início da infecção ou mais tarde (WITTMANN, 1986).

Outros sinais clínicos observados são variados, e irão depender da idade do animal, do período pós-infecção e da virulência da cepa infectante. Podem variar de inaparentes a distúrbios respiratórios, digestórios, reprodutivos e nervosos. Perda de apetite, cansaço, espasmos nos músculos da face, disfagia, abortamentos, transtornos de comportamento e convulsões podem ser observados na infecção pelo vírus da DA (MRAVAK et al., 1987; VERPOEST et al., 2017).

Clinicamente a DA se assemelha a outras doenças frequentes em suínos. Porém, a ocorrência de problemas reprodutivos em fêmeas, acompanhados de sinais neurológicos em leitões durante o crescimento, é altamente sugestiva da DA (LEE e WILSON, 1979). A infecção em porcas no início da gestação, pode resultar em morte e abortamento ou em absorção fetal.

Já na metade da gestação, ocorrem abortamento e mumificação fetal, enquanto que no final da gestação podem ocorrer abortamento, natimortos ou nascimento de leitões fracos que morrem dentro de poucos dias de vida (WITTMANN, 1986; VERPOEST et al., 2017).

Quanto mais jovens os suínos mais sérios são os sinais clínicos e maior é a taxa de mortalidade, podendo chegar a 100% dos leitões com até duas semanas de idade (VERPOEST et al., 2017). Não apenas a idade pode influenciar a morbidade e a mortalidade, mas a quantidade de vírus e a sua virulência, somado às condições individuais do animal infectado, manejo do rebanho e situações de estresse, facilitam a disseminação e manutenção do vírus no rebanho (WITTMANN, 1986; GROFF et al., 2005).

Em suínos acima de dois meses os sinais respiratórios são mais evidentes, apresentando rinite com espirros e descarga nasal que podem evoluir para pneumonia. Sinais respiratórios são os primeiros observados em animais adultos, juntamente com os problemas reprodutivos em matrizes. A frequência de infecções secundárias é alta, e quando ocorrem podem elevar a morbidade a 100% (METTENLEITER, 1996; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005; OIE, 2012).

Suínos adultos infectados podem sobreviver à infecção e não apresentarem prurido e outros sinais, e mesmo assim tornarem-se portadores latentes do vírus e a DA passar despercebida no plantel. Esses animais são os principais responsáveis pela disseminação do vírus, porque não desenvolvem os sinais clínicos e permanecem imperceptíveis no rebanho, transmitindo o vírus pelo contato direto com animais saudáveis e entre animais de diferentes espécies que tenham acesso as instalações da criação (METTENLEITER, LUKÀCS e RIZHA, 1985; McCAW, 1997; MORES et al., 2007; PUSIC et al., 2011). Essa disseminação acontece por contaminação de fômites no ambiente, por contato com outros animais e até, em menor frequência, por aerossóis (GROFF et al., 2005; WOZNIAKOWKI e SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015, VERPOEST et al., 2017).

2.2.5 Diagnóstico

No Brasil os testes sorológicos autorizados para o diagnóstico da DA são o ELISA e a virusneutralização. Podendo também ser utilizadas as técnicas de isolamento viral e a PCR no diagnóstico direto, pesquisando a presença do SHV-1 em amostras de cérebro, baço, linfonodos, pulmão, secreção nasal e fetos abortados (BRASIL, 2007). Segundo a OIE a pesquisa indireta pode ser também realizada por aglutinação em látex, mas o ELISA tem sido extensivamente usado e atualmente existem vários kits comerciais (OIE, 2012).

A PCR tem sido utilizada como meio diagnóstico para detecção do SHV-1 em suínos infectados, e demonstra boa especificidade. Porém, apesar desta técnica ser capaz de detectar animais infectados ainda no período pré-soroconversão, quando ela é usada para diferenciar animais infectados de animais vacinados sua sensibilidade diminui consideravelmente, o que é atribuído a variação gênica que pode existir no gene gE das cepas virulentas (MA et al., 2008). A PCR duplex também demonstra eficácia, contudo, a adição de dois pares de *primers* na mesma reação diminui a sensibilidade do teste (FONSECA JR, 2010). Além do mais, o gene da gE possui uma alta quantidade de guanina e citosina o que pode dificultar a amplificação na PCR (SERENA et al., 2013).

Existem algumas contradições no uso da PCR para diagnóstico do SHV-1. O tipo e a quantidade da amostra coletada e a forma de armazenamento e transporte podem resultar na diminuição da carga viral e do seu material genético pela presença de DNase celular, que, somando com a possível incompatibilidade dos *primers* ou sondas, podem impossibilitar a detecção do agente (MA et al., 2008). A PCR também tem demonstrado limitações em identificar o agente causador em amostras de soro animal (AN et al., 2013).

O teste diagnóstico comercial mundialmente usado é o ELISA indireto competitivo (PRV gPI-Antibody Test Kit - IDEXX), que pesquisa anticorpos anti-gE no soro animal testado. Esse ELISA utiliza mAb conjugado com a enzima peroxidase que reconhece apenas um ou dois epítomos da gE (MORENKOV et al., 1999 e 1997; WU et al., 2017). Entretanto, outros testes de ELISA têm sido estudados para o imunodiagnóstico da DA (RO et al., 1995; SEBASTIAN et al., 2008; SERENA et al., 2013).

O uso de mAbs para apenas um ou alguns epítomos da gE é insuficiente para o diagnóstico eficaz em um rebanho para identificar os animais infectados (MORENKOV, FODOR e FODOR, 1999). Existem cepas de campo que podem apresentar perdas ou variação antigênica em epítomos específicos, fragilizando a sensibilidade de testes diagnósticos que utiliza apenas mAbs (VAN OIRSCHOT, 1986; BEM-PORAT, 1986; AN et al., 2013). Teste diagnóstico com mAbs também pode apresentar limitações na identificação de anticorpos virais na fase aguda da infecção (VAN OIRSCHOT, 1986).

Estudo comparando a capacidade de identificação de animais infectados no início da infecção, demonstrou que o ELISA foi superior a virusneutralização, detectando anticorpos anti-SHV-1 nesses animais a partir do 5º dia pós infecção, e ao 7º dia pós infecção já foi capaz de identificar $\geq 95\%$ dos animais positivos, enquanto que para a virusneutralização essa detecção ocorreu no 8º e 21º dias, respectivamente. A superior sensibilidade do ELISA em

detectar animais recém-infectados, quando comparado à virusneutralização, reforça seu uso como teste diagnóstico confiável para a DA (OREN et al., 1993).

Em leitões, o contato com cepa virulenta do SHV-1, somado a presença de anticorpo anti-SHV-1 transmitido passivamente pelo colostro, pode resultar em animais infectados de forma latente. Esses animais apresentam naturalmente resposta humoral baixa, o que pode resultar em falso-negativos. Os animais com infecção latente também podem apresentar redução da resposta humoral, e por isso serem de difícil identificação em imunodiagnóstico (VAN OIRSCHOT et al., 1986).

Comparando a sensibilidade de dois ELISAs, um utilizando a proteína gG e o outro utilizando a gE, observou-se que o último foi capaz de identificar todos os leitões infectados experimentalmente, enquanto que o primeiro não. Com esses resultados verifica-se maior resposta humoral contra a gE do que contra a gG e maior sensibilidade do ELISA utilizando gE (McCAW, 1997).

Um grande desafio para o imunodiagnóstico é possuir sensibilidade capaz de detectar animais infectados no período de latência, em animais senis, e no início da infecção, onde o título de anticorpos anti-SHV-1 diminui naturalmente (McCAW, 1997; SERENA et al., 2013). Outro desafio encontrado é a limitação encontrada por alguns laboratórios em estabelecer a estrutura e os equipamentos necessários para o uso da plataforma ELISA no imunodiagnóstico (ECHEVERIA, NOSETTO e ETCHEVERRIGARAY, 2000).

As análises realizadas com a utilização do teste de ELISA com gE recombinante são importantes para o rastreamento epidemiológico da doença. Somado ao baixo custo e a capacidade de diferenciar os animais infectados dos vacinados, os resultados obtidos são importantes para o reforço da vigilância epidemiológica e a criação de novas estratégias de controle da DA (SILVA et al., 2005).

ELISA *sandwich* utilizando a proteína gE e a proteína gB ou gD demonstrou alta especificidade. Com a utilização de mAbs específicos não ocorreu reação cruzada para nenhuma proteína. Não houve competição entre o conjugado específico para gE e para os mAbs contra gB e gD e vice-versa, o que sugere a possibilidade do uso dessas proteínas em ELISA para diagnosticar a DA (MORENKOV et al., 1997).

Estudo comparativo entre dois ELISAs indiretos, um utilizando a proteína gE recombinante produzida em *E. coli*, e outro utilizando a mesma proteína purificada a partir de partículas virais de cultivo celular, demonstrou sensibilidades de 80% e 97%, respectivamente. Essa grande diferença pode ser atribuída a ausência de epítomos conformação-dependentes imunodominantes da gE da *E. coli* (MORENKOV, FODOR e FODOR, 1999 e 1997).

Todas as vacinas comercialmente disponíveis foram desenvolvidas com a gE ausente. Essa proteína é idêntica em centenas de cepas circulantes no mundo, e por ser muito imunogênica pode ser usada em testes diagnósticos para diferenciação de animais naturalmente infectados e animais vacinados (VAN OIRSCHOT, 1986 e 1990; MOORMANN et al., 1990; MENGELING et al., 1997; MA, 2008; GU et al., 2015).

Em teste ELISA utilizando revelação com troca de cátions, foi possível identificar anticorpos anti-SHVI e distinguir soros de suínos infectados e não infectados. Neste teste são utilizados anticorpos monoclonais anti-IgG suína conjugados com nanocristais. Este método apresenta alta sensibilidade e capacidade de diagnosticar a DA em animais no início da infecção, quando os níveis de anticorpos ainda são baixos (LI et al., 2013).

ELISA competitivo utilizando mAbs anti-SHVI foi elaborado para o diagnóstico da DA. O teste usa anticorpo anti-coelho conjugado com a urease, e apesar de ser de execução mais simples e não necessitar de leitor de densidade ótica, o teste pode apresentar grande número de falsos negativos, pois com o tempo de reação alguns poços podem absorver a amônia liberada por poços negativos e também mudar de coloração. Este sistema é muito sensível, podendo ser influenciado por pequenas variações de pH (ECHEVERIA, NOSETTO e ETCHEVERRIGARAY, 2000).

Apesar de serem identificados os epítomos da gE, estudo utilizando anticorpo contra apenas um epítomo, localizado no domínio C, para identificar animais infectados com SHV-1 através de ELISA direto, demonstrou ser insuficiente. Com a possibilidade de haver perda ou variação da conformação de epítomos, a sensibilidade de teste diagnóstico baseado em apenas um epítomo pode diminuir. Portanto, quanto maior a variação de anticorpos anti-gE ou mais próximo que uma proteína recombinante for da gE nativa maior a possibilidade de identificar antígeno ou anticorpo, respectivamente, em animais infectados através de testes diagnósticos (VAN OIRSCHOT, 1986; MORENKOV et al., 1997).

Uma proteína recombinante constituída dos epítomos imunodominantes A, B e D da gE, e produzida em baculovírus, foi utilizada em ELISA recombinante para diagnosticar animais infectados e diferencia-los dos vacinados. Utilizando a virusneutralização como teste padrão observou-se concordância de 77% entre os testes, com especificidade de 86,7% e sensibilidade de 69,7% para o ELISA recombinante. Dos 109 animais positivos na virusneutralização apenas 76 foram detectados no ELISA, demonstrando que esta estratégia não é eficaz para um programa de erradicação da DA (SERENA et al., 2011).

Um fragmento correspondente a região amino-terminal da gE foi clonado e expresso com sucesso em sistema eucarioto utilizando *E. coli*, e a proteína recombinante manteve a

antigenicidade da gE. Apesar da gE ser uma glicoproteína e requerer processamentos pós-traducionais para ser imunorreativa, particularmente nesse caso, provavelmente por se tratar de uma sequência peptídica pequena (134 aminoácidos), ela apresentou-se imunorreativa em ensaios de *immunoblotting* (RO et al., 1995). Porém, sistema de expressão procarioto foi incapaz de produzir uma gE recombinante imunorreativa, seja pelo processamento e conformação inapropriados quanto pela incapacidade do sistema em sintetizar a gE completa. Sistemas utilizando células de rato e de insetos também foram incapazes de produzir a gE recombinante imunorreativa (KIMMAN et al., 1996).

Um fragmento do gene da gE, compreendido entre os nucleotídeos 60 e 370, foi clonado e expresso em Baculovírus, e a proteína recombinante foi usada em ensaios de ELISA. Este teste diagnóstico apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 81%, quando comparado o resultado com outros cinco ELISAs comerciais (KIMMAN et al., 1996). No Brasil foi desenvolvido um protocolo para expressão do gene gE completo recombinante em Baculovírus, resultando na produção de uma proteína de peso molecular entre 82.2 e 115.5 kDa. Contudo, este sistema apresenta dispendiosa técnica, por necessitar de cultivo celular, e resulta em baixo rendimento (VAN OIRSHOT et al., 1988; MELLENCAMP et al., 1989; WOLFER, 1990; PEETERS, 1992; XUAN, 1995; MORENKOV et al., 1997; ZARIPOV, 1998; NISHIKAWA, 1999; DAMBROS et al., 2007; SERENA et al., 2013).

A sequência compreendida entre os nucleotídeos 151 e 714, correspondente a uma fração da porção extramembranar da gE, referente a apenas alguns dos seus epítomos de superfície, foi clonada e expressa em *Pichia pastoris* para uso em ELISA. Porém, quando testada e comparada com ELISA comercial (PRV gPI-Antibody Test Kit - IDEXX) demonstrou sensibilidade inferior (AO et al., 2003).

Uma porção N-terminal da proteína gE também foi produzida em *P. pastoris* para ser usada em diagnóstico por ELISA indireto, contudo apresentou muitos resultados falsos e não teve boas sensibilidade e especificidade. Quando essa proteína foi purificada e utilizada em ELISA sandwich indireto, com o uso de anticorpo anti-gE monoclonal, também comparando com ELISA comercial (IDEXX), apresentou melhores sensibilidade (89,53%) e especificidade (90,32%).

Assim, o uso de proteína recombinante formada com apenas um ou alguns epítomos de um antígeno limita sua capacidade de identificar animais infectados (VAN OIRSCHOT, 1986; JACOBS et al., 1990; MORENKOV, FODOR e FODOR, 1999), o que já foi evidenciado para gE (SERENA et al., 2011), onde apenas o gene referente ao epítomo D dessa proteína foi expresso e a proteína recombinante usada em ELISA, que apresentou especificidade de 86,7%

e sensibilidade de 69,7%, e essa baixa sensibilidade de um imunodiagnóstico é indesejada para um teste utilizado como ferramenta em estratégias de controle da DA (MORENKOV et al., 1997).

2.2.6 Controle

Algumas medidas podem ser aplicadas na tentativa de controlar e erradicar a DA. O sacrifício de todos os animais de um rebanho onde tenha sido identificada a presença do vírus, respeitar o período do vazio sanitário, e a substituição destes por animais oriundos de rebanho livre do SHV-1 é uma medida radical e dispendiosa, porém eficaz, de eliminar o vírus. É indicada em rebanhos com prevalência maior que 10% (GROFF et al., 2005; MORES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014).

Outras medidas menos radicais e menos onerosas, e realizadas na maioria dos programas de controle e erradicação da DA, são a vacinação do rebanho; a realização de testes sorológicos nos animais do plantel; e a retirada dos animais positivos, repetindo o teste periodicamente. A separação de recém-nascidos de fêmeas infectadas antes que eles mamem o colostro permite que a leitegada não seja infectada, o que tem sido difícil de executar em rebanhos pequenos com pouco espaço e pouca tecnificação empregada na criação (McCAW, 1997; GROFF et al., 2005).

Sem a implementação de programa de erradicação da DA, a possibilidade da ocorrência de surtos aumenta cerca de 15% a cada ano. Sucesso no controle da doença com a implementação de programa de erradicação da doença resulta no ganho da produtividade na suinocultura, onde o custo para produzir um suíno é menor. Dessa forma, o produtor gasta menos investimentos para produção e pode repassar parte desse desconto para o consumidor (ANDERSSON et al., 1997).

A vacinação do rebanho, além de diminuir a disseminação do vírus, garante moderada proteção contra a infecção, e reduz os sinais clínicos nos animais infectados. A vacina utilizada deve ser escolhida de forma que permita o uso de teste diagnóstico que diferencie animais vacinados de animais infectados (WOZNIAKOWSKI e SAMOREK-SALAMONOWICS, 2015; YIN et al., 2017).

Em muitos países onde a DA é endêmica o uso de vacinação é comum no controle da doença. Apesar de não impedir a infecção causada pelo vírus, nem o estabelecimento do estado de latência, a vacinação diminui a mortalidade e a transmissão do vírus no rebanho (VAN OIRSCHOT, 1986). O uso de vacina deletada tem diminuído e até inibido os sinais clínicos em

animais infectados, assim como a eliminação do vírus, o que tem favorecido o controle da disseminação no rebanho (YIN et al., 2017).

Na China a DA tem sido controlada com o uso da vacinação, o que tem diminuído a grande perda econômica causada pela DA (AN et al., 2013; GU et al., 2015; YIN et al., 2017). A utilização de teste diagnóstico que faça distinção entre anticorpos vacinais e anticorpos causados pela infecção é fundamental para esse objetivo (VAN OIRSCHOT, 1986; MORENKOV et al., 1997).

Na década de 90 o *The Scientific Veterinary Committee* examinou e aprovou vacinas atenuadas e vacinas deletadas para uso em programas de controle e erradicação do SHV-1. Com a erradicação do SHV-1 na Dinamarca e na Grã-Bretanha todos os membros da União Europeia se interessaram em fazer o mesmo. A Comunidade Europeia decidiu usar a estratégia vacinal, com vacinas deletadas para o gene gE (MOYGNAGH, 1997).

Em 1993, na Europa, foram decididas as regras de comércio de suínos. Estabeleceu-se áreas livres, o ELISA como teste padrão, os laboratórios responsáveis, criação e divulgação de esquema simples de produção de suínos, aprovação de plano de erradicação em Luxemburgo, e garantia da entrada de suínos em partes das áreas livres (MOYGNAGH, 1997).

Apesar da vacinação ter demonstrado eficácia na proteção do rebanho e na diminuição da disseminação da DA, a maioria, se não todos, os pequenos criadores de suínos ainda não adotaram essa medida de controle em suas criações. Assim, a ausência de manejo tecnificado e de medidas de controle desses pequenos rebanhos, distribuídos por todas as regiões, os tornam potenciais reservatórios e disseminadores do SHV-1 (PUSIC et al., 2011).

Para que haja sucesso em um programa de controle e erradicação algumas regras devem ser seguidas: o programa deve ser adotado em todos os rebanhos; todos animais diagnosticados positivos devem ser removidos; e devem ser estabelecidas normas para o controle do trânsito de animais entre as zonas (GROFF et al., 2005). Programas que determinem a vacinação compulsória tendem a ser mais eficientes quando comparados aos que apenas sugerem a vacinação (MOYGNAGH, 1997)

Baseado nas legislações do SUASA e da OIE, o MAPA elabora as diretrizes para a saúde animal e define requisitos sanitários e ações de combate às doenças. Segundo o SUASA, coordenado pelo MAPA, no caso da DA a estratégia do Brasil é a regionalização das ações (BRASIL, IN 08 de 2007), contudo a adesão dos Estados da Federação é voluntária. Além disso, considerando a importância econômica da suinocultura e visando evitar a disseminação de doenças e assegurar níveis desejáveis de produtividade, foram estabelecidas as GRSCs, livres de importantes enfermidades como a DA (BRASIL, IN 19 de 2002). Assim, a comercialização

e distribuição, no território nacional, de suínos destinados à reprodução, assim como a sua participação em exposições, feiras e leilões, são permitidas somente àqueles provenientes de GRSCs, que são monitoradas semestralmente para DA, com a utilização de testes sorológicos (BRASIL, 2013).

No Brasil a DA é endêmica, e atualmente, só o Estado de Santa Catarina é considerado oficialmente livre sem vacinação (CIACCI-ZANELLA et al., 2008). Segundo o SUASA, para a certificação e monitoramento de GRSCs é necessário o teste semestral para DA (BRASIL, 2013).

O teste diagnóstico deve ser capaz de diferenciar animais infectados de animais vacinados, apresentar baixo custo e confiáveis sensibilidade e especificidade. A sensibilidade do teste deve ser suficiente para identificar resposta humoral no início da infecção e no período de latência, onde o título de anticorpos diminui (Fig. 3) (VAN OIRSCHOT, 1986; MENGELING et al., 1997; KINKER, 1997; McCAW, 1997).

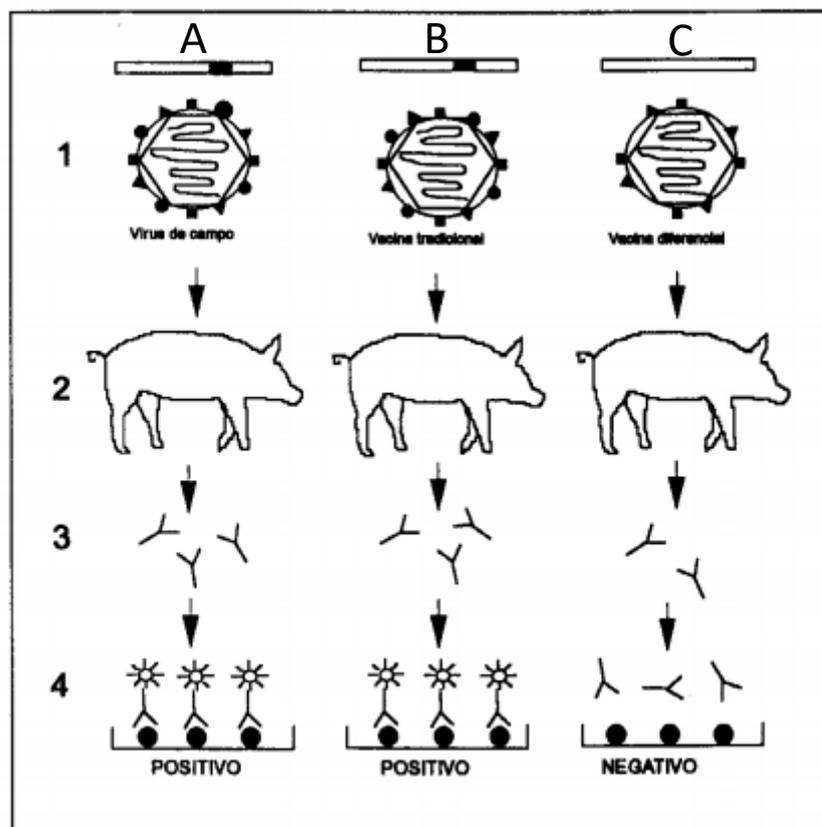


Figura 3. Diferente resposta imunológica obtida a partir de diferentes estratégias de vacinação e, conseqüentemente, diferente resposta ao exame diagnóstico. Resposta obtida quando o animal está infectado com vírus selvagem (A), vacinado com vírus sem genes deletados (B) e vacinado com vírus com gene deletado (C) (CIACCI-ZANELLA e FLORES, 1995).

2.2.7 Vacinas

No território nacional só é possível o uso de vacinas vivas e atenuadas que sejam deletadas pelo menos para o gene gE, e somente com autorização do MAPA. O uso de teste diagnóstico que permitam a detecção de anticorpos contra a proteína gE permite a identificação e diferenciação de animais infectados e vacinados (BRASIL, IN 08 de 2007).

A glicoproteína gE, também denominada gI (algarismo um romano), é uma proteína de membrana tipo 1 que está complexada com a glicoproteína gI (letra i maiúscula), e sua porção C terminal interage com a proteína VP22 (UL49). Seu gene (US8) está localizado entre os nucleotídeos 123.502 e 125.235, com tamanho de 1.733 nucleotídeos, e sua forma peptídica possui 577 aminoácidos e peso molecular de 62,4 kDa. A gE tem papel fundamental na virulência do SHV-1 (METTENLEITER, 1996; KLUPP et al., 2004; POMERANZ, REYNOLDS e HENGARTNER, 2005).

A gE é a principal responsável pela neuroinvasão do vírus e por sua disseminação célula-célula, mas não é essencial para que ocorra a infecção. A ausência da gE em cepas atenuadas permite a primeira infecção, que ocorre nas células epiteliais e em neurônios primários nasais, o que possibilita a instalação da latência. Contudo, impede a transferência transsináptica do vírus para outros neurônios, interrompendo o ciclo e a virulência do vírus (METTENLEITER, 2000).

Além da gE ser fundamental para a disseminação do vírus célula-célula, é a proteína mais importante na produção da resposta humoral em suínos naturalmente infectados. E seu gene é expresso em altos níveis na célula infectada e é a principal constituinte do envelope viral. A gE também possui epítomos que são conservados nas cepas do SHV-1 (MORENKOV et al., 1997).

Jacobs et al. (1990) utilizando anticorpos monoclonais produzidos em ratos identificaram seis domínios imunogênicos na gE recombinante. Cinco desses domínios estavam localizados entre os aminoácidos 52 e 238 da proteína gE indicando que apenas essa região era imunogênica em ratos, podendo ser a região imunodominante da gE. O sexto domínio não foi possível ser detectado com monoclonal em imunodiagnóstico, quando utilizado fração da proteína adicionada a proteína de fusão, o que indica se tratar de um epítomo conformação-dependente. Já Morenkov et al. (1997) identificaram a região compreendida entre os aminoácidos 1 e 125 como sendo imunodominante na gE.

Em estudo de mapeamento dos epítomos da gE, utilizando 17 mAbs específicos para esta proteína, foram identificados nove grupos de domínios antigênicos topologicamente

distintos com 11 diferentes epítomos, que foram diferenciados em conformação-dependente e conformação-independente, sendo os conformacionais epítomos imunodominantes da gE (MORENKOV et al., 1997).

Desses nove epítomos encontrados, oito são conformação-dependente, sendo esta conformação a característica principal na sua imunogenicidade. Epítomos conformação-dependente são importantes na indução da resposta imune em ratos, e essenciais para a produção de alto títulos de anticorpos durante a infecção natural em suínos pelo SHV-1. Em experimento onde se avaliou comparativamente a resposta humoral provocada pelos diferentes epítomos da gE, animais infectados com epítomos lineares apresentaram resposta humoral fraca, enquanto animais infectados com os epítomos conformacionais apresentaram maior produção de anticorpos (MORENKOV et al., 1997).

Em fibroblasto humano o SHV-1 atua retendo o MHC de classe 1 (MHC-1) no retículo endoplasmático, através da atuação da ICP47, que é uma proteína viral que impede o transporte do MHC-1 para o lúmen. Esta etapa ocorre imediatamente após os primeiros genes virais serem expressos, a não apresentação do MHC-1 ou apresentação desta molécula malformada resulta no impedimento resposta celular reconhecer as células infectadas e destruí-las (YORK, 1996).

Os neurônios, onde ocorre a forma latente do SHV-1, são células que naturalmente expressam pouca ou nenhuma quantidade o gene do MHC-1 (YORK, 1996).

A resposta humoral produzida pelo SHV-1 varia consideravelmente entre os suínos infectados e o período da infecção. A imunogenicidade das proteínas virais pode variar entre as cepas, como também provocar estímulo para a produção de anticorpos para diferentes epítomos da mesma proteína em diferentes títulos (GU et al., 2015). Esse conhecimento é importante no desenho e na escolha da vacinação, do método diagnóstico e de medidas de controle da doença (MORENKOV et al., 1997).

Avanços na biologia molecular e engenharia genética têm permitido métodos diagnósticos e a criação de vacinas que tem favorecido a diminuição do prejuízo causado pela DA, como também o controle e a erradicação do vírus (PEJSAK e TRUSZCZYNSKI, 2006).

A vacina mais utilizada mundialmente nos programas de controle e erradicação do SHV-1 é a cepa atenuada Bartha K61 (AN et al., 2013). Essa cepa possui uma grande deleção dentro da região Us do genoma viral. Essa deleção gênica compreende parte do gI, todo o gE e Us9, e parte do Us2. Também apresenta mutações no gene gC e no gene UL21 (Fig. 4). Para que a cepa retome a sua virulência é necessário o conserto dessas três variações, que dificilmente acontece e garante sua segurança (METTELEITER, 2000).

Em estudos realizados com a substituição da região Us do genoma de cepas virulentas, onde está localizado o gene gE, pela mesma região de cepas não virulentas, verificou-se que o vírus permanecia imunogênico, porém não apresentava mais virulência. Sendo assim, vírus recombinante com essa engenharia genética usado na formulação de vacinas garante resposta humoral contra o SHV-1 e diminui o risco de ocorrência de sinais clínicos e disseminação do vírus (METTENLEITER, LUKÀCS e RIZHA, 1985; MOORMANN et al., 1990; GU et al., 2015).

Cepa vacinal que tenha o gene da proteína gE deletado não provoca resposta imunológica para a proteína gE, conseqüentemente não produz anticorpo anti-gE, em compensação produz resposta com maior título de anticorpo anti-gB. Isso ocorre porque na ausência da gE o vírus produz maior quantidade da gB, que é uma proteína imunogênica muito importante para sua infectividade, e a resposta no animal se torna mais intensa para essa proteína (BEM-PORAT et al., 1986; YIN et al., 2017). Essa característica, e também por seu uma proteína conservada entre diferentes cepas virais, permite o uso da proteína gB em associação com a proteína gE em teste diagnóstico para identificar animais infectados dos animais vacinados e sadios (METTENLEITER, 1996; GU et al., 2015).

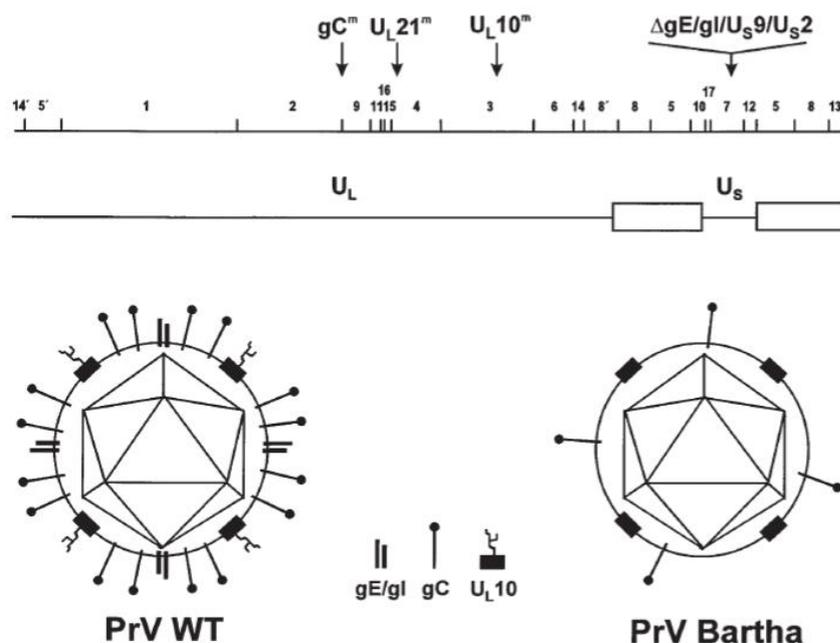


Figura 4. Mutações presentes no genoma da cepa Bartha. A deleção na região US que engloba os genes gI, gE, Us9 e Us2 e as mutações nos genes gC, UL10 e UL21 são indicadas. As conseqüências dessas mutações na estrutura do envelope da cepa Bartha são descritas esquematicamente abaixo em comparação com a cepa selvagem. (METTENLEITER, 2000).

As glicoproteínas gC e gE não são essenciais para o crescimento viral *in vitro* nem para a transmissão do vírus. Assim, podem ter seus respectivos genes deletados para formar cepas vacinais que não apresentem virulência (Fig. 5) (BEM-PORAT et al., 1986; METTENLEITER, 2000).

Vacinas de DNA utilizando plasmídeos contendo os genes referentes as proteínas gB, gC, e gD, foram avaliadas em rebanho suíno. Apesar de induzir resposta imune e garantir certa proteção contra o SHV-1, as vacinas de DNA não foram eficazes para evitar os sinais clínicos, morte, e excreção nasal do vírus (METTENLEITER, 2000; DORY, 2005).

Vacinas atenuadas têm mais capacidade de induzir resposta imune duradoura do que vacinas inativadas. No entanto, a primeira apresenta o risco de terem sido atenuadas insuficientemente, ou ainda apresentarem instabilidade genética. Já vacinas com proteínas recombinantes podem ser usadas com o objetivo de minimizar os riscos de infecção com o manuseio do vírus (HAN, 2008).

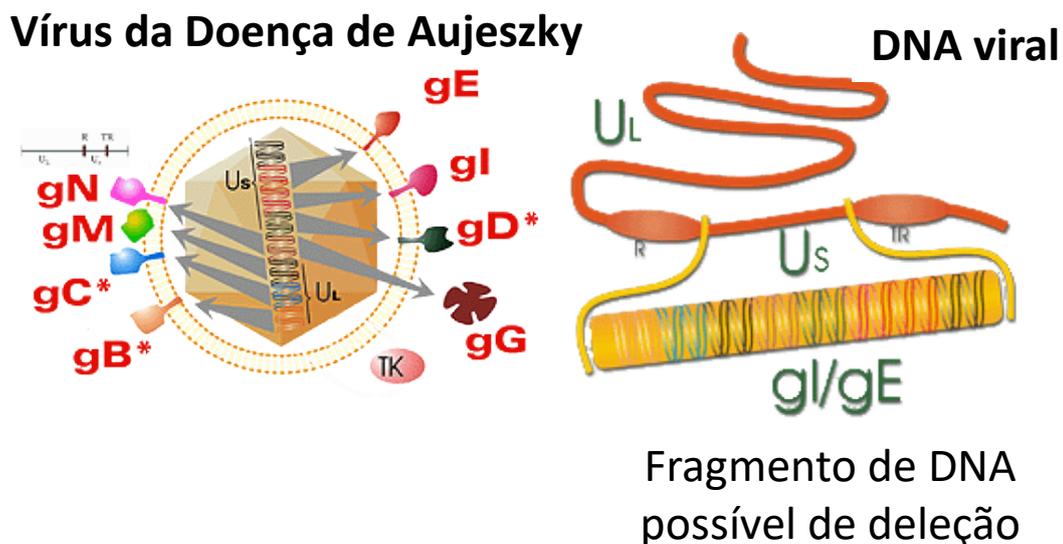


Figura 5. Esquema didático do SHV-1 demonstrando suas glicoproteínas gN, gM, gC, gB, gE, gI, gD, gG e a TK (esquerda), e ilustração do genoma viral destacando as duas regiões U_L e U_S , destacando a presença da glicoproteína gE localizada na região U_S (direita). (<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun/noveno2.htm>) Acesso em 24/01/2013.

O Comitê do Instituto de Conservação Pecuária (*Comitee of the Livestock Conservation Institute*) junto com um grupo de consultores técnicos, baseados em estudos de 1991 da Universidade de Nebraska (EUA), decidiram que toda vacina atenuada usada no programa de controle do SHV-1 nos EUA deveriam ser gene deletada e compatível com o ELISA gE (USA, 2017).

Apesar de ser a vacina mais utilizada mundialmente no controle e prevenção da DA, o surgimento de novas variantes do vírus tem demonstrado sua possível fragilidade de produção de anticorpos e consequente proteção. A comparação da quantidade de anticorpos produzidos com a vacina Bartha-K61 e com a vacina formada a partir da deleção do gene gE da cepa isolada durante surto da DA na China demonstrou baixa proteção da Bartha-K61 contra a nova cepa (AN et al., 2013; GU et al., 2015; ZHOU et al., 2017).

Comparando a proteção conferida por duas vacinas comerciais, uma com os genes gG e TK deletados, e outra com os genes gG, TK e gE deletados, observou-se após a infecção, que houve 62,5% de morte após a vacinação com a primeira, e apenas 25% dos animais vacinados apresentaram anticorpos anti-SHV-1. Já os animais vacinados com a segunda vacina apresentaram anticorpos contra o vírus, e houve 50% de sobrevivência quando expostos ao vírus selvagem. Contudo, mesmo com a deleção do gene gE os animais vacinados apresentaram resposta imune aceitável e risco de mortalidade muito inferior (WEIGEL, HAHN, e SCHERBA, 2003).

O uso de vacinas atenuadas ou com engenharia genética pode resultar na introdução do vírus em rebanhos livres, como também pode resultar na infecção de animais selvagens que tenham contato com o rebanho, o que acontece principalmente na prática de vacinação extensiva. Cepas virulentas derivadas de cepas vacinais já foram isoladas de animais de campo com sinais clínicos da DA na Polônia, demonstrando o risco do surgimento dessas novas cepas (CHRISTENSEN et al., 1992). Contudo, com o avanço nos estudos de engenharia genética, já existem vacinas capazes de provocar resposta imune satisfatória e não causar sinais clínicos nem ser transmitida entre animais (MOORMANN et al., 1990). Vacinas inativadas, atenuadas ou de DNA reduzem os sinais clínicos e podem proteger o animal da morte causada pelo vírus, mas não previne contra a sua infecção (WOZNIAKOWSKI e SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015; GU et al., 2015).

Diferenças na neutralização de diferentes cepas do SHV-1 de diferentes regiões geográficas com pool de soros de suínos infectados demonstra que há variação antigênica entre as glicoproteínas do vírus. Essa variação, somada a flutuante resposta imunológica nos suínos infectados naturalmente, fragiliza o uso de teste diagnóstico baseado em mAbs para reconhecer apenas um ou alguns poucos epítomos de glicoproteínas (BEM-PORAT et al., 1986; VAN OIRSCHOT, 1986; YIN et al., 2017).

2.3 Sistemas de Expressão

Várias são as proteínas recombinantes produzidas atualmente na indústria farmacêutica (insulina, albumina, hormônio do crescimento, e muitas outras) e para uso em imunodiagnósticos. A produção de proteína por sistemas de expressão heterólogo permite produção em quantidade e qualidade desejáveis. Contudo, para isso a escolha do sistema ideal, que seja rápido e produtivo em fornecer uma proteína funcionalmente desejável e com qualidade é o fator mais importante (DEMAIN e VAISHMAV, 2009). A rápida expressão de gene recombinante, a fácil flexibilidade e operacionalidade desse sistema, somando a capacidade de determinar estrutura terciária, estudos enzimáticos, função estrutural e farmacêutica, têm feito da *E. coli* o sistema de expressão mais utilizado mundialmente para produção de proteína heteróloga (LAVALLIE et al., 2000).

A facilidade de manipulação do sistema de expressão a *E. coli*, relativamente baixo custo de cultivo e a produção de alta qualidade e quantidade da proteína fazem desse sistema uma escolha interessante para a indústria. No entanto, existem algumas limitações da *E. coli* principalmente no que diz respeito a performance metabólica do micro-organismo (Tabela 1) (DEMAIN e VAISHMAV, 2009; CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2013).

Tabela 1. Características do sistema de expressão por *E. coli*.

Vantagens	Desvantagens
Rápida expressão	Dificuldade em produzir proteínas com pontes dissulfeto
Epítomos não-conformacionais estáveis	Dificuldade em produzir epítomos conformacionais
Alto rendimento	Não realiza a glicosilação de proteínas
Fácil manipulação genética e de cultivo	Produz proteínas com endotoxinas
Pouco oneroso	Formação de acetato resulta em toxicidade celular
Rápida produção em massa	Proteínas produzidas em corpúsculos de inclusão são inativas e requerem redobramento

Fonte: DEMAIN e VAISHMAV (2009, adaptado).

Sob condições de produção de proteína recombinante, a *E. coli* pode perder imediatamente alguns mecanismos de ajuste de crescimento celular. O hospedeiro pode responder a essa mudança destruindo seus ribossomos ou induzindo a proteólise, interferindo na síntese proteica e na estabilidade da proteína sintetizada, respectivamente (CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2013).

Além disso, este sistema apresenta limitações na produção de proteínas recombinantes que requerem certos processamentos pós-traducionais, incluindo limitações em produzir epítomos conformacionais. Essas limitações foram percebidas quando proteína traduzida de gene eucarioto foi produzida neste sistema procarioto, e sua conformação final demonstrou-se diferente de sua forma nativa. Assim, proteínas que necessitem de modificações pós-traducionais como alto nível de pontes dissulfeto, glicosilação, lipidação, prolina *cis/trans* isomerização, dissulfeto isomerização e fosforilação, não apresentarão sua conformação nativa, o que pode ou não interferir na imunorreatividade e na bioatividade da proteína recombinante (MORENKOV, FODOR e FODOR, 1999 e 1997; DALY e HEARN, 2005).

Além das limitações quanto à capacidade de realizar modificações pós-traducionais, que são essenciais em produção de glicoproteínas imunorreativas, o sistema de expressão em *E. coli* necessita de processo de recuperação da proteína recombinante, que é bastante laborioso, pelo fato da proteína ser produzida, principalmente, de maneira insolúvel e inativa sob a forma de corpúsculo de inclusão (CEREGHINO e GREGG, 2001; DEMAINE e VAISHMAV, 2009).

Apesar dessas limitações o sistema de expressão *E. coli* tem demonstrado eficácia em produzir proteínas heterólogas imunorreativas, apesar de serem glicosiladas e apresentarem epítomos conformacionais em sua forma nativa (MORENKOV, FODOR e FODOR, 1999; RO et al., 1995; MORENKOV et al., 1999).

Sistema utilizando células de insetos, que é um sistema eucarioto onde o vetor mais usado é o Baculovírus, tem sido utilizado na expressão de proteínas heterólogas recombinantes. Modificações pós-traducionais; dobramento proteico com formação de pontes dissulfeto; alto nível de produção; não apresenta limites do tamanho da proteína a ser produzida; e simultânea expressão de múltiplos genes são algumas das várias vantagens desse sistema. Porém, incorreta glicosilação, incapacidade de secreção, dobramento proteico inadequado e baixo nível de expressão já foram relatados nesse sistema, além disso, ele apresenta dispendiosa técnica (DEMAINE e VAISHMAV, 2009; SERENA et al., 2011 e 2013).

A principal vantagem do sistema que utiliza células de mamíferos é sua capacidade em produzir proteínas de mamífero adequadamente, pois realiza as etapas pós-traducionais necessária para a essas proteínas. Contudo, o baixo nível de secreção, o alto custo dos processos

desse sistema, e o potencial risco de contaminação por vírus e bactérias limitam o seu uso (DEMAIN e VAISHMAV, 2009; SERENA et al., 2011 e 2013).

Animais transgênicos também têm sido utilizados para expressar genes de proteínas heterólogas em secreções corpóreas (leite, urina, sangue, plasma seminal, etc), produzindo proteína tão ativa como a nativa, a melhor custo/benefício que expressão em células de mamíferos. A via de secreção mais utilizada é pelo leite, contudo, o tempo de espera até a lactação, o fato de a lactação ser temporária e o custo com a criação do animal são fatores limitantes desse sistema (COLLARES et al., 2007). O uso de plantas transgênicas também tem sido eficaz na expressão de genes heterólogos, com produção a menor custo, em menor tempo e com baixo risco de contaminação quando comparado com animais e outros sistemas. A desvantagem no uso de plantas é a possibilidade de contaminação com pesticidas, herbicidas e metabólitos tóxicos da própria planta (DEMAIN e VAISHMAV, 2009).

Assim como *E. coli* a *P. pastoris* também é uma alternativa econômica, de fácil manipulação genética e de cultivo, produz a proteína recombinante de interesse em alta qualidade e quantidade. Adicionalmente, se tratando de um sistema de expressão eucarioto a *P. pastoris* possui as vias de síntese proteica que realizam a maioria das modificações pós-traducionais que garantem a produção da proteína heteróloga bioativa ou imunorreativa, e ainda possui vias de secreção para essa proteína (CEREGUINO et al., 2002; DALY e HEARN, 2005; MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Contudo, tem apresentado dificuldade em produzir proteínas heterólogas estáveis e com bom rendimento, apresentando muitas reações inespecíficas no ELISA (informações não publicadas).

A secreção do produto recombinante para o meio de cultivo evita o contato dela com a toxicidade intracelular resultante do acúmulo de metabólitos, e o fato da *P. pastoris* secretar baixos níveis de proteínas nativas simplifica o processo de purificação. Adicionalmente, a passagem dessa proteína pela via de secreção permite que ocorram os eventos pós-traducionais como maturação proteolítica, glicosilação, processamento de sequência sinal e formação de pontes dissulfeto (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; DAMASCENO, HUANG e BATT, 2012). No entanto, pode ser necessário etapas de purificação para seu posterior uso em imunodiagnósticos, para evitar o alto índice de falsos-positivos decorrentes de reações inespecíficas (informações não publicadas) (WU et al., 2017).

A rápida expressão do gene heterólogo em *P. pastoris* já resultou em defeituoso dobramento proteico, produzindo falha na conformação e prejudicando o acabamento da proteína e a formação de epítomos dependentes da conformação (DALY e HEARN, 2005; WU et al., 2017).

Alguns epítomos da gE do SHV-1 já foram clonados em *P. pastoris* e foram utilizados em ELISA, onde apresentaram especificidade e sensibilidade abaixo de 90% (AO et al., 2003; WU et al., 2017). Nós também clonamos a gE do SHV-I em *P. pastoris* e testamos em ELISA, mas os resultados apresentaram muitas reações inespecíficas e pouca capacidade de identificar os soros de animais infectados (dados não apresentados).

2.4 Codon Usage

O código genético é organizado em 61 trincas (códon) de nucleotídeos que codificam 20 aminoácidos diferentes, e três códon de terminação que indicam o fim da tradução. Cada aminoácido pode ter até seis códon diferentes para sua síntese e cada organismo possui códon preferenciais. O que determina a preferência de códon em um organismo é a relação de RNA transportador (RNAt) que ele possui no citoplasma referente a estes códon (GUSTAFSSON, GOVINDARAJAN e MINSHULL, 2004).

Um gene recombinante que possua códon raros para o hospedeiro pode interferir na tradução e resultar em substituição errônea de aminoácidos e, conseqüentemente, mudanças críticas na proteína recombinante produzida (CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2013). Uma estratégia comum para melhorar o nível e a qualidade da expressão de um gene recombinante é alterar os códon de modo que eles reflitam os códon preferenciais de utilização do hospedeiro sem modificar a sequência de aminoácidos da proteína (GUSTAFSSON, GOVINDARAJAN e MINSHULL, 2004).

2.5 Proteína de fusão

Proteínas de fusão têm sido usadas como estratégias para garantir atribuições à proteína recombinante. Essas estratégias permitem o aumento da produção, solubilidade, estabilidade, purificação por afinidade da proteína recombinante (LAVALLIE et al., 2000; MALHOTRA, 2009).

A proteína de fusão pode apresentar afinidade por anticorpos ou metais, permitindo assim sua ligação com essas estruturas e a posterior retirada das proteínas indesejadas da solução. Ainda podem apresentar um sítio de clivagem para sua remoção e liberação da proteína recombinante (MAINA et al., 1988; LAVALLIE et al., 2000).

A Tiorredoxina (Trx) é uma proteína encontrada em todas as células vivas, tanto nos procariotos como nos eucariotos. É uma proteína de aproximadamente 12 kDa e é estável ao

calor, e tem transferido essa característica para proteínas recombinantes fusionadas a ela (HOLGREN, 1985; BARTOLUCCI et al., 1997; SUDAN, TEWARI e SINGH, 2015).

A Trx tem aumentado os níveis de expressão do gene heterólogo, como também sua solubilidade e estabilidade em solução, e ainda tem a cauda de histidina que permite a imunodeteção e eficiente purificação da proteína. A Trx está localizada na porção N-terminal da proteína, e pode usar os sítios de início da tradução. Esta localização ainda permite a fácil remoção da proteína de fusão com o uso de endoproteases (BARTOLUCCI et al., 1997; MALHOTRA, 2009; XU et al., 2016).

A Trx é dotada de grande estabilidade conformacional quando submetida a altas temperaturas, característica não encontrada nas proteínas da *E. coli*. Ela apresenta uma redução da superfície acessível ao solvente, que é uma característica estrutural das proteínas termoestáticas o que favorece a estrutura secundária e terciária da proteína recombinante, o que é necessário para a o imunodiagnóstico (BARTOLUCCI et al., 1997; SUDAN, TEWARI e SINGH, 2015).

Essa característica termoestável permite a utilização de etapas de purificação da proteína recombinante através de protocolos de aquecimento e centrifugação (LAVALLIE et al., 2000). Apesar de serem produzidas de forma insolúveis em corpúsculos de inclusão na *E. coli*, a Trx tem permitido maior expressão do gene heterólogo e melhor rendimento da proteína recombinante, com alto nível de pureza e imureatividade. A Trx melhora a solubilidade citoplasmática da proteína heteróloga com pontes de sulfeto e também, provavelmente, por aumentar sua característica hidrofóbica (XU et al., 2016).

3. REFERÊNCIAS

- AN, T. Q.; PENG, J. M.; TIAN, Z. J.; ZHAO, H. Y.; LI, N.; LIU, Y. M.; CHEN, J. Z.; LENG, C. L.; SUN, Y.; CHANG, D. e TONG, G. A. Z. Pseudorabies Virus Variant in Bartha-K61-Vaccinated Pigs, China, 2012. **Emerging Infectious Disease**. v. 19, n° 11, p. 1749-1755, 2013.
- ANDERSSON, H.; LEXMON, A.; ROBERTSSON, J.; LUNDEHEIM, N. e WIERUP, M. Agricultural policy and social returns to eradication programs: the case of Aujeszky's disease in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 29, p. 311-328, 1997.
- AO, J.; WANG, J.; CHEN, X.; WANG, X. e LONG, Q. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV gE-ELISA. **Journal of Virological Methods**. v. 114, p. 145–150, 2003.
- ABIPECS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. 2013. Disponível em: <http://www.abipecs.com.br>. Acesso em 25/01/2013.
- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. *Relatório Anual 2017*. São Paulo, 2017. 98 p. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf. Acesso em: 21 ago. 2017.
- AUJESZKY, A.; Ueber eine new Infektions krankheit bei Haustieren. *Zentbl. Bakt. ParasitKde*.1902. In LEE e WILSON, 1979
- BARTOLUCCI, S.; GUAGLIARDI, A.; PEDONE, E.; DE PASCALE, D.; CANINIO, R.; CAMARDELLA, L.; ROSSI, M.; NICASTRO, G.; CHIARA, C.; FACCI, P.; MASCETTI, G. e NICOLINI, C. Thioredoxin from *Bacillus acidocaldarius*: characterization, high-level expression. in *Escherichia coli* and molecular modelling. **Biochemical Journal**. v. 328, p. 277-285, 1997.
- BEN-PORAT, T.; DeMARCHI, J. M.; LOMNICZI, B. e KAPLAN, A. S. Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. **Virology**. v. 154, p. 325-334, 1986.
- BRASIL - Instrução Normativa Nº 19, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002. DOU de 01/03/2002 Seção 1.
- BRASIL - Instrução Normativa Nº 8, DE 03 DE ABRIL DE 2007. Diário Oficial da União de 10/04/2007, Seção 1, Página 1.

BRASIL. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>. Acesso em 23/01/2013.

CARNEIRO, S.; FERREIRA, E. C. e ROCHA, I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 164, n. 3, p. 396-408, 2013. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.026>)

CEREGHINO, J. L. e GREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, p. 45-66, 2001.

CEREGUINO, G.L. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 329-332, 2002.

CHRISTENSEN, L. S.; MEDVECZKY, I.; STRANDBYGAARD, B. S. e PEJSK, Z. Characterization of field isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus) as derivatives of attenuated vaccine strains. **Archives of Virology**. v.124, p. 225-234, 1992.

CIACCI-ZANELLA, J. R. e FLORES, E. F. Vacinas com marcadores antigênicos contra o Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e o Vírus da Doença de Aujeszky. **Ciência Rural**. v. 25, n. 2, p. 331-341, 1995.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; AMARAL, A. L.; VENTURA, L. V. e BORTOLUZZI, N. M. H. Erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina: importância da condição sanitária das leitões de reposição. **Ciência Rural, Santa Maria**. vol. 38, n. 3, p. 749-754, 2008.

COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V. e DESCHAMPS, J. C. Animais Transgênicos Biorreatores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**. v. 31, n. 4, p. 462-478, 2007.

DALY, R. e HEAM, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**. v. 18, p. 119-138, 2005.

DAMASCENO, L. M.; HUANG, C. J. e BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Microbiology Biotechnology**. v. 93, p. 31-39, 2012.

DAMBROS, R. M. F.; RIBEIRO, B. M.; AGUIAR, R. W. S.; SCHAEFER, R.; ESTEVES, P. A. PERECMAINS, S.; SIMON, N. L.; SILVA, N. C.; COLDEBELLA, M. e CIACCI-ZANELLA, J. R. Clonning and expression of Aujeszky's disease virus glycoprotein E (gE) in a baculovirus system. **Brazilian Journal of Microbiology**. vol. 38, p. 494-499, 2007.

- DEB, R.; CHAKRABORTY, S.; VEEREGOWDA, B.; VERMA, A. K.; TIWARI, R. e DHAMA, K. Monoclonal antibody and its use in the diagnosis of livestock diseases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. v. 4, p. 50-62, 2013.
- DEMAIN, A. L. e VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 297-306, 2009.
- DORY, D.; TORCHÉ, A. M.; BÉVEN, V.; BLANCHARD, P.; LOIZEL, C.; CARIOLET, R. e JESTIN, A. Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC e gD glycoproteins. **Vaccine**. v, 23, p. 3483-3491, 2005.
- ECHEVERRÍA, M. G.; NOSETTO, E. O. e ETCHEVERRIGARAY, M. E. Evaluation of a blocking ELISA using a urease conjugate for the detection of antibodies to pseudorabies vírus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 12, p. 266-268, 2000.
- FONSECA JR, A. A.; DIAS, N. L.; LEITE, R. C.; HEINEMANN, M. B. e REIS, J. K. P. PCR duplex para diferenciação de amostras vacinais e selvagens do vírus da doença de Aujeszky. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 62, p. 1259-1262, 2010.
- FREULING, C.; MULLER, T. e METTENLEITER, T. C. Vaccines against Pseudorabies virus (PRV). **Veterinary Microbiology**. v. 206, p. 3-9, 2017.
- GROFF, F. H. S. Epidemiologia e controle dos focos de doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. 2005. 45p. **Dissertação**. Universidade Federal de Santa Maria, Medicina Veterinária.
- GU, Z.; DONG, J.; WANG, J.; HOU, C.; SUN, H.; YANG, W.; BAI, J. e JIANG, P. A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge. **Virus Research**. v. 195, p. 57-63, 2015.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S. e MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **TRENDS in Biotechnology**. v. 22, p. 346-353, 2004.
- HAN, Y. W.; ALEYAS, A. G.; GEORGE, J. A.; KIM, S. J.; KIM, H. K.; YOON, H. A.; YOO, D. J.; KANG, S. H.; KIM, K. e EO, S. K. Polarization of protective immunity induced by replication-incompetent adenovirus expressing glycoproteins of pseudorabies virus. **Experimental and Molecular Medicine**. v. 40, n. 6, p. 583-595, 2008.
- HIPÓLITO, O.; FREITAS, M. G. e FIGUEIREDO, J. B. Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos. 1965. 4ª Ed. Edições Melhoramentos, São Paulo.

- HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review of Biochemistry**. v. 54, p. 237-271, 1985.
- ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), 2017. Virology Division – IUMS. < <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776> > Acesso em 24/10/2017.
- JACOBS, L.; MELOEN, R. H.; GIELKENS, A. L. J. e VAN OIRSCHOT, J. T. Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus. **Journal of General Virology**. v. 71, p. 881-887, 1990.
- JIA, B. e JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biology**. v. 6, n. 8, 2016. doi: 10.1098/rsob.160196.
- KIMMAN, T. G.; DE LEEUW, O.; KOCHAN, G.; SZEWCZYK, B. W.; ROOIJ, E. V.; JACOBS, L.; KRAMPS, J. A. e PEETERS, B. An Indirect Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using Baculovirus-Expressed Antigen for the Detection of Antibodies to Glycoprotein E of Pseudorabies Virus and Comparison of the Method with Blocking ELISAs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 3, p. 167-174, 1996.
- KINKER, D. R.; SWENSON, S. L. WU, L. e ZIMMERMAN, J. J. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. **Veterinary Microbiology**. v. 55, p. 99-106, 1997.
- KLUPP, B. G.; HENGARTHER, C. J.; METTENLEITER, T. C. e ENQUIST, L. W. Complete, Annotated Sequence of the Pseudorabies Virus Genome. **Journal of Virology**. v. 78, n. 1, p. 424-440, 2004.
- KOSOBOKOVA, E. N.; SKRYPNIK, K. A. e KOSORUKOV, V. S. Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. **Biochemistry (Moscow)**. v. 81, n. 3, p. 187-200, 2016.
- LAVALLIE, E. R. L.; LU, Z.; DIBLASIO-SMITH, E. A.; COLLINS-RACIE, L. A. e MCCOY, M. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Methods in Enzymology**. v. 326, p. 322-340, 2000.
- LEE, J. Y. S. e WILSON, M. R. A Review of Pseudorabies (Aujeszky's disease) in pigs. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 20, n. 3, p. 65-69, 1979.
- LI, X. P.; CHEN, K.; HUANG, L.; LU, D. L.; LIANG, J. G. e HAN, H. Y. Sensitive immunoassay for porcine pseudorabies antibody based on fluorescence signal amplification

induced by cation exchange in DdSe nanocrystals. **Microchimica Acta**. v. 180, p. 303-310, 2013.

MA, K. M. W.; LAGER, J. A.; RICHT, W. C.; STOFFREGEN, F. e ZHOU, K. Y. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**. v. 20, p. 440-447, 2008.

MACAULEY-PATRICK S., FAZENDA, M. L., McNEIL, B., HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**. v. 22, p. 249-270, 2005.

MAINA, C. V.; RIGGS, P. D.; GRANDEA, A. G.; SLATKO, B. E.; MORAN, L. S.; TAGLIAMONTE, J. A.; MCREYNOLDS, L. A. e GUAN, C. D. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. **Gene**. v. 74, p. 365-373, 1988.

MALHOTRA, A. Tagging for protein expression. **Methods in Enzymology**. v. 463, n. 16, p. 239-258, 2009.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/sanidade-suidea>. Acesso em 23/08/2017.

MARCO, A.; CASATTA, E.; SAVARESI, S. e GEERLOF, A. Recombinant proteins fused to thermostable partners can be purified by heat incubation. **Journal of Biotechnology**. v. 107, p. 125-133, 2004.

McCAW, M. B.; OSORIO, F. A.; WHEELER, J.; XU, J. e ERICKSON, G. A. Effect of maternally acquired Aujeszky's disease (pseudorabies) virus-specific antibody in pigs on establishment of latency and seroconversion to differential glycoproteins after low dose challenge. **Veterinary Microbiology**. v. 55, 1997.

MELLENBAMP, M. W.; PFEIFFER, N. E.; SUITER, B. T.; HARNESS, J. R. e BECKENHAUER, W. H. Identification of Pseudorabies Virus-Exposed Swine with a gI glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 27, n. 10, p. 2208-2213, 1989.

MENGELING, W. L.; BROCKMEIER, S. L.; LAGER, K. M. e VORWALD, A. C. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. **Veterinary Microbiology**. n. 55, p. 49-60, 1997.

- METTENLEITER, T. Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999. **The Veterinary Record**. v. 31, p. 99-115, 2000.
- METTENLEITER, T. C. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 54, p. 221-229, 1996.
- METTENLEITER, T. C., Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**. v. 92, p. 197-206, 2003.
- METTENLEITER, T. C.; LUKÀCS, N. e RIZHA, H. J. Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. **Journal of Virology**. v. 56, n. 1, p. 307-311, 1985.
- MILICEVIC, V.; RADOJICIC, S.; VALCIC, M.; IVOVIC, V. e RADOSAVLJEVIC, V. Evidence of Aujeszky's disease in wild boar in Serbia. **BMC Veterinary Research**. v. 12, n. 134, 2016.
- MOORMANN, R. J. M.; ROVER, T.; BRIAIRE, J.; PEETERS, B. P. H.; GIELKENS, A. L. J. e VAN OIRSCHOT, J. T. Inactivation of the thymidine kinase gene of a gI deletion mutant of pseudorabies virus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. **Journal of General Virology**. v. 71, p. 1591-1595, 1990.
- MORENKOV, O. S.; FODOR, N. e FODOR, I. Indirect ELISAs based on recombinant and affinity-purified glycoprotein e of Aujeszky's Disease Virus to differentiate between vaccinated and infected animals. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 47, p. 137-150, 1999.
- MORENKOV, O. S.; FODOR, N.; SOBKO, Y. A. e FODOR, I. Immunological Characterization of Glycoprotein E of Aujeszky's disease virus. **Virus Research**. v. 51, p. 65-79, 1997.
- MORES, N.; AMARAL, A. L.; VENTURA, L.; ZANELLA, J. R. C. e MORI, A., DAMBRÓS, J. A., PROVENZANO, G. Disseminação do vírus da doença de Aujeszky, envolvendo o comércio de reprodutores suínos de reposição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p.1382-1387, 2007.
- MOYNAGH, J. Aujeszky's disease and the European Community. **Veterinary Microbiology**. v. 55, p. 159-166, 1997.
- MRAVAK, S.; BIENZLE, U.; FELDMEIERS, H.; HAMPL, H. e HABERMEHL, K. Pseudorabies in mam. **The Lancet**. 1987.

MULLER, T.; HAHN, E. C.; TOTTEWITZ, F.; KRAMER, M.; KLUPP, B. G.; METTENLEITER, T. C. e FREULING, C. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. **Journal of Wildlife Disease**. v. 156, p. 1691-1705, 2011.

NAUWYNCK, H. J. Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. **Veterinary Microbiology**. v. 55, p. 3-11, 1997.

NI, J. Q.; ZHANG, C. L.; TONG, G. Z.; QIU, H. J., WANG. Y. F. e TIAN, Z. J. Expression of truncated gE gene of pseudorabies virus (PRV) and primary application in differential diagnosis of PRV vaccination and infection. **Chinese Journal of Biotechnology**. v. 20, n. 4, p. 526-531, 2004.

NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; KIMURA, M. e OTSUKA, H. Characterization of Pseudorabies vírus glycoprotein B expressed by canine herpesvirus. **Journal of Veterinary Medical Science**. v, 61, n. 10, p. 1113-1117, 1999.

OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines Terrestrial Animals: Chap 2.1.2. Aujeszky's disease. 2012.

OLIVEIRA, L. G.; OLIVEIRA, M. E. F.; ALMEIDA, H. M. S.; GATTO, I. R. H. e SAMARA, S. I. Os desafios da Doença de Aujeszky em suínos para a defesa sanitária animal. **Veterinária e Zootecnia**. v. 21, n. 3, p. 370-381, 2014.

OREN, S. L.; SWENSON, S. L.; KINKER, D. R.; HILL, H. T.; HU, H. e ZIMMERMAN, J. Evaluation of serological pseudorabies tests for the detection of antibodies during early infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 5, p. 529-533, 1993.

PEETERS, B.; WIND, N.; HOOISMA, M.; WAGENAAR, F.; GIELKENS, A. e MOORMANN, R. Pseudorabies virus envelope glycoprotein gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. **Journal of Virology**. v, 66, n. 2, p. 894-905, 1992.

PEJSAK, X. K. e TRUSZCZYNSKI, M. J. Aujeszky's Disease (Pseudorabies). **Disease of Swine**. 9^a Edition, 2006.

POMERANZ, L. E.; REYNOLDS, A. E. e HENGARTNER, C. J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 69, n. 3, p. 462-500, 2005.

- PUSIC, I.; PRODANOV-RADULOVIC, J.; DOSEN, R.; STOJANOV, I.; STOJANOVIC, D. e PETROVIC, T. Epizootical Characteristics of Aujeszky's Disease in Vojvodina Region and Biosecurity Concernes. **Biotechnology in Animal Husbandry**. v. 27, p. 875-882, 2011.
- RANGWALA, S. H.; FINN, R. F.; SMITH, C. E.; BERBERICH, S. A.; SALSGIVER, W. J.; STALLINGS, W. C.; GLOVER, G. I. e OLINS, P. O. High-level production of active HIV-1 protease in *Escherichia coli*. **Gene**. v. 122, p. 263-269, 1992.
- RO, L. H.; LAI, S. S.; HWANG, W. L.; CHOU, H. H.; HUANG, J. N.; CHANG, E. L. e YANG, H. L. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays. **American Journal of Veterinary Research**. v. 5, p. 56-61, 1995.
- SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S. e SILVA, L. C. Características da Carne Suína. **Universidade Federal do Espírito Santo – UFES**. Boletim Técnico, 2007.
- SEBASTIÁN, S. G.; FILGUEIRA, D. M. P.; CASADO, E. G.; NUNEZ, M. C.; RAMOSA, I. S.; TABARÉSC, E. e ESCRIBANO, J. M. DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. **Journal of Virological Methods**. v. 153, p. 29-35, 2008.
- SERENA, M. S.; METZ, G. E.; CORVA, S. G.; MÓRTOLO, E. C. e ECHEVERRÍA, M. G. A differential ELISA based on recombinant immunodominant epitopes of the gE gene of SHV-1 in a baculovirus–insect cell system to discriminate between pigs infected naturally with pseudorabies and vaccinated pigs. **Journal of Virological Methods**. v. 171, p. 388-393, 2011.
- SERENA, M. S.; GEISLER, C.; METZ, G. E.; CORVA, S. G.; MÓRTOLO, E. C.; LARSEN, A.; JARVIS, D. e ECHEVERRÍA, M. G. Expression and purification of Suid Herpesvirus-1 glycoprotein E in the baculovirus system and its to use to diagnose Aujeszky's disease in infected pigs. **Protein Expression and Purification**. v. 90, n. 1, p. 1-8, 2013.
- SILVA, A. D.; SORTICA, V. A.; BRAGA, A. C.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; ESTEVES, P. A.; RIJSEWIJK, F.; ROSA, J. C. A.; BATISTA, H. B. C. R.; OLIVEIRA, A. P. e ROEHE, P. M. Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 2003. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 25, n. 1, p. 21-24, 2005.
- SMITH, G. Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. **Annual Review of Microbiology**. v. 66, p. 153–176, 2012.

SUDAN, V.; TEWARI, A. K. e SINGH, H. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in bovines from Kerala, India using a recombinant surface antigen 1 ELISA. **Biologicals**. v. 43, p. 250-255, 2015.

USA- The Center for Food Security & Public Health. Iowa State University. **Aujeszky's Disease, Pseudorabies, Mad Itch**. 2017.

VAN OIRSCHOT, J. T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**. v. 73, p. 195-205, 1999.

VAN OIRSCHOT, J. T., HOUWERSL, D. J., RZIHA, H. J., MOONEN, P. J. L. M. Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. **Journal of Virological Methods**. v. 22, p. 191-206, 1988.

VAN OIRSCHOT, J. T.; TERPSTRA, C.; MOORMANN, R. J.; BERNIS, A. J. e GIELKENS, A. L. Safety of an Aujeszky's disease vaccine based on deletion mutant strain 783 which does not express thymidine kinase and glycoprotein I. **The Veterinary Record**. v. 127, n. 18, p. 443-446, 1990.

VAN OIRSCHOT, J. T.; RZIHA, H. J.; MOONEN, P. J. L. M.; POL, J. M. A. e VAN ZAANE, D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. **Journal of General Virology**. Short communication. v. 67, p. 1179-1182, 1986.

VERPOEST, S.; CAY, B.; FAVOREEL, H. e REGGE, N. D. Age-Dependent Differences in Pseudoreabies Virus Neuropathogenesis and Associated Cytokine Expression. **Jornal of Virology**. v. 91, p. 1-17, 2017.

WEIGEL, R.M.; HAHN, E. C. e SCHERBA, G. Survival and immunization of raccoons after exposure to pseudorabies (Aujeszky's disease) virus gene-deleted vaccines. **Veterinary Microbiology**. v. 92, p. 19-24, 2003.

WITTMANN, G. Aujeszky's disease. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)**. v. 5, n. 4, p. 959-97, 1986.

WOLFER, U.; KRUF, V.; SAWITZKY, D.; HAMPL, H.; WITTMANN-LIEBOLD, B. e HABERMEHL, K. Processing of Pseudorabies virus glycoprotein gII. **Journal of Virology**. v. 64, p. 3122-3125, 1990.

- WOZNIAKOWKI, G. e SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. Animal herpesviruses and their zoonotic potential for cross-species infection. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 22, n. 2, p. 191-194, 2015.
- WU, C. Y.; WU, C. W.; LIAO, C. M.; CHIEN, M. S. e HUANG, C. Enhancing expression of the pseudorabies virus glycoprotein E in yeast and its application in an indirect sandwich ELISA. **Journal of Applied Microbiology**. v. 123, n. 3, p. 594-601, 2017.
- XU, W.; ZHAO, Q.; XING, L. e LIN, Z. Recombinant production of influenza hemagglutinin and HIV-1 GP120 antigenic peptides using a cleavable self-aggregating tag. **Nature**. v. 6, 2016.
- XUAN, X.; NAKAMURA, T.; IHARA, T.; SATO, I.; TUCHIYA, K.; NOSETTO, E.; ISHIHAMA, A. e UEDA, S. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus. **Virus Research**. v, 36, p. 151-161, 1995.
- YIN, Y.; XU, Z.; LIU, X.; LI, P.; YANG, F.; ZHAO, J.; FAN, Y.; SUN, X. e ZHU, L. A live gI/gE-deleted pseudorabies virus (PRV) protects weaned piglets against lethal variant PRV challenge. **Virus Genes**. v. 53, p. 565-572, 2017.
- YONG, T.; HUAN-CHUN, C.; SHAO-BO, X.; YA-LI, Q.; QI-GAI, H. e YU-QI, R. Development of a Latex agglutination test using the major epitope domain of Glycoprotein E of Pseudorabies Virus expressed in *E. coli* to differentiate between immune responses in pigs naturally infected or vaccinated with Pseudorabies Virus. **Veterinary Research Communications**. v. 29, p. 487-497, 2005.
- YORK, Y. A. Immune evasion strategies of the herpesviruses. **Chemistry & Biology**. v. 3, n. 5, p. 331-335, 1996.
- ZARIPOV, M. M.; MORENKOV, O. S.; SIKLODI, B.; BARNA-VETRO, J.; GYONGYOSI-HORVATH, A. e FODOR, I. Glycoprotein B of Aujeszki's disease virus: topographical epitope mapping and epitope-specific antibody response. **Research in Virology**. v, 149, p. 29-41, 1998.
- ZHOU, J.; LI, S.; WANG, X.; ZOU, M. e GAO, S. Bartha-k61 vaccine protects growing pigs against challenge with na emerging variant pseudorabies virus. **Vaccine**. v. 35, p. 1161-1166, 2017.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

ELISA DIVA para diagnóstico da doença de Aujeszky empregando gE recombinante

***Autor para correspondência:**

Roberto Soares de Castro. Email: robertosoarescastro@gmail.com

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE.

Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n-Dois Irmãos, Recife, PE. 52171-900, Brasil.

¹ Artigo formatado para a revista *Journal of Virological Methods*

RESUMO

A principal alternativa para o controle da Doença de Aujeszky (DA) tem sido a associação de vacinas deletadas para o gene que codifica a glicoproteína E (gE) do Herpesvírus suíno 1 (SHV-1) com testes diagnósticos para detecção de anticorpos específicos contra a gE nos animais infectado, diferenciando-os dos vacinados - DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated individuals). Este trabalho teve como objetivo desenvolver um ELISA DIVA para diagnóstico da DA em suínos, empregando gE recombinante (gErec). A proteína foi produzida fusionada à tiorredoxina (Trx) por *E. coli* transformada com gene sintético com códons otimizados clonado no vetor pET102/D-TOPO. Após a clonagem e expressão a proteína gErec foi detectada em *Western blotting* utilizando anticorpo anti-His. O ELISAgErec foi realizado com o antígeno gErec diluído 1:200, soros 1:20 e conjugado proteína G peroxidase 1:100.000. A sensibilidade analítica (SeA) do ELISAgErec foi definida com base no teste do soro OIE internacional de referência para a DA (ADV-1); para avaliação da especificidade analítica (SpA) foram testados um pool de soros de animais Livres de Patógenos Específicos (SPF), soro hiperimune de suíno SPF vacinado contra parvovírus suíno, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, vírus influenza, *Mycoplasma* e soro de suíno SPF vacinado contra a DA, que possui anticorpo contra a gB do SHV-1. O soro ADV-1 reagiu acima dentro limite de detecção preconizado pela OIE; já os demais soros apresentaram resultados negativos. O ponto de corte, a sensibilidade (SeD) e especificidade (SpD) diagnósticas do ELISAgErec foram determinados por meio da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic), considerando, como verdadeiros positivos, 208 soros positivos na virusneutralização para SHV-1 e, como negativos, 391 soros de suínos originários de Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas (GRSC), livres da DA. A análise da curva ROC, mostrou a $DO > 0,13$ como o ponto de corte do ELISAgErec, correspondente aos maiores valores de SeD - 97,60% (IC 95% de 94,5 a 99,2%) e de SpD - 96,42% (IC de 94,1 a 98,0%), e área sob a curva de 0,99 (IC de 0,99 a 1,00; $p < 0,0001$), o que corresponde ao desempenho de um teste altamente acurado. Dependendo do uso proposto, foram definidos dois pontos de corte para o ELISAgErec ($DO > 0,09$ e $DO > 0,18$) que resultaram em valores próximos a 100% de SeD e SpD, respectivamente, mantendo os correspondentes valores de SeD ou SpD acima de 90%. O ponto de corte $DO > 0,09$ poderá ser usado em situações epidemiológicas que necessitem de teste de elevada SeD, como no controle/erradicação ou prevenção do ingresso de animais positivos em rebanhos livres; já o ponto de corte $DO > 0,18$ poderá ser empregado em áreas livres para monitorar os rebanhos, o que requer SpD máxima.

Palavras-chave: antígeno recombinante, estabilidade proteica, Tiorredoxina, DIVA, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

The major alternative for the control of Aujeszky's Disease (AD) has been an association of deleted vaccines for the gene encoding the porcine Herpesvirus 1 glycoprotein E (gE) with diagnostic tests for the detection of specific antibodies against gE in infected animals, differentiating them from those vaccinated - DIVA (differentiating infected from vaccinated individuals). This work aimed at a DIVA ELISA for the diagnosis of AD in swine, using recombinant gE (gErec). The protein was produced fused to thioredoxin (Trx) by *E. coli* transformed with synthetic gene with optimized codons cloned into pET102 / D-TOPO vector. After cloning and expression, a gErec protein was detected in Western blot using anti-His antibody. ELISAgErec was performed with gErec antigen diluted 1:200, sera 1:20 and protein conjugate G peroxidase 1:100,000. The analytical sensitivity (SeA) of ELISAgErec was defined based on the international reference OIE serum test for AD (ADV-1); for the evaluation of analytical specificity assessment (SpA), were tested a pool of specific pathogens free (SPF) animal sera, swine hyperimmune SPF serum vaccinated against swine Parvovirus, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Influenza virus, Mycoplasma, and swine SPF serum vaccinated against DA, which has antibody against gB protein from SHV-1. Serum ADV-1 reacted above the detection limit recommended by the OIE; the other sera presented negative results. The ELISAgErec diagnostic cut-off, sensitivity, and specificity (DSp) were determined by ROC (Receiver Operational Characteristic) curve analysis, considering as positive 208 sera in virus neutralization for SHV-1 and , as negative, 391 sera from pigs from Certified Porcine Breeding Farms free from AD. Analysis of the ROC curve showed $OD > 0.13$ as the ELISAgErec cutoff, corresponding to the highest values of DSe - 97.60% (95% CI 94.5 to 99.2%) and DSp - 96.42% (CI 94.1 to 98.0%), and area under the curve of 0.99 (CI of 0.99 to 1.00, $p < 0.0001$), which corresponds to the performance of a highly accurate test. Depending on the proposed use, were defined two cut-off points for the ELISAgErec ($OD > 0.09$ and $OD > 0.18$) which resulted in values close to 100% of DSe and DSp, respectively, maintaining the corresponding values of DSe or DSp above 90%. The cutoff point $OD > 0.09$ can be used in epidemiological situations that require a high safety test, such as control/eradication or prevention of entry of positive animals into free herds; since the cutoff $OD > 0.18$ can be used in free areas to monitor herds, which requires maximum DSp.

Key words: Recombinant antigen, protein stability, Thioredoxin, DIVA, immunodiagnosis.

1. Introdução

A Doença de Aujeszky (DA), causada pelo Herpesvírus Suíno 1 (SHV-1), é uma virose que leva a consideráveis perdas econômicas à indústria suinícola mundial. É uma doença de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal, o que gera a possibilidade de criação de barreiras sanitárias para o comércio internacional (OIE, 2017).

O SHV-1 é um vírus envelopado que apresenta importantes glicoproteínas em sua superfície. Algumas estão envolvidas na interação vírus-hospedeiro e são imprescindíveis à replicação viral (gB, gH, gD, gL e gK), outras (gC, gE, gG, gI e gM) não são essenciais (Nauwynck, 1997). Com base nisto, foram desenvolvidas vacinas atenuadas com cepas cujos genes gE, gC ou gG foram deletados (Freuling et al., 2017), o que permitiu o uso de teste sorológico para detecção de anticorpos específicos contra a proteína correspondente ao gene deletado, para diferenciação dos animais infectados dos vacinados - DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated individuals), termo proposto por Van Oirschot (1999).

O controle da DA tem sido conduzido com o uso de vacinas deletadas para os genes gE, gC ou gG, monitoramento dos rebanhos por testes DIVA e eliminação dos animais positivos e, na fase final de erradicação, dos rebanhos positivos (Ciacci-Zanella e Flores, 1995). Apesar de não impedir a infecção nem o estabelecimento do estado de latência, a vacinação diminuiu consideravelmente os sinais clínicos, a mortalidade e a transmissão do vírus no rebanho (Van Oirschot, 1999; Freuling et al., 2017).

As cepas vacinais mais utilizadas para a DA são atenuadas por deleção do gene gE do SHV-1 (Freuling et al., 2017). A proteína gE, produzida em altos níveis na célula infectada, é fundamental para a disseminação e virulência do SHV-1, sendo a proteína mais importante na produção da resposta humoral em suínos naturalmente infectados. Além disso, a gE é altamente conservada entre as diferentes amostras virais de campo, inclusive as brasileiras (Mengeling et al., 1997; Fonseca Júnior, 2010).

Os ELISA DIVA para DA foram desenvolvidos inicialmente com anticorpos monoclonais (mAbs) contra epítomos de gE, empregados em ensaios competitivos (Van Oirschot, 1986; Van Oirschot et al., 1988; Morenkov, Fodor e Fodor, 1999) e, mais recentemente, com o uso de gE recombinantes produzidas em baculovírus (Kimman et al., 1996; Serena et al., 2011), *Escherichia coli* (Morenkov, Fodor e Fodor, 1999) e *Pichia pastoris* (Ao et al., 2003). Apesar de ser o ELISA com mAbs o mais empregado como DIVA, a produção

de mAbs é dispendiosa, emprega cultivo celular ou animais de laboratório (Deb et al., 2013) e, no caso específico da gE, pode haver o risco de variação antigênica das cepas de campo exatamente nos epítomos para os quais os mAbs foram produzidos, conforme alertado no trabalho original de desenvolvimento (Van Oirschot et al., 1986; Bem-Porat et al., 1986).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um ELISA DIVA para diagnóstico da DA em suínos, empregando gE recombinante, produzida em *E. coli*, fusionada à tiorredoxina com elevada solubilidade, estabilidade e imunorreatividade.

2. Material e Métodos

2.1 Construção da sequência do gene gE sintético

A sequência gênica utilizada compreende a porção extramembranar da gE, entre os nucleotídeos 96 e 1262 da sequência do gene desta proteína, com tamanho de 1166 nucleotídeos e 389 aminoácidos (Sebastián et al., 2008). O gene da gE presente no genoma completo do SHV-1 disponível no NCBI, acesso NC_006151.1 (Klupp et al., 2004), foi escolhido para realização das modificações necessária e síntese da sequência otimizada para expressão em *E. coli*.

Com o objetivo de aumentar o rendimento da sua expressão a sequência sintética sofreu modificações para adequação ao *codon usage* de *E. coli*. Também foi inserido o sítio de restrição *XbaI* na extremidade 5'. As modificações dos códons foram realizadas com o *software gcua version 2.0 October 8th 2006*, e a sequência foi produzida pela empresa *EpochBiolabs* (EUA) e fornecida inserida no plasmídeo pBluescript II SK (pBSK), vetor de transporte que possui como marca de seleção o gene de resistência à Ampicilina. Por PCR foi adicionado o sítio de restrição *XhoI* na extremidade 3'.

Após a PCR, o gene gE sintético foi digerido com as enzimas *XbaI* e *XhoI* (Promega®), purificado (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega®) e usado em reação de ligação com o vetor de passagem Pgem®-T Easy (PROMEGA; 3015 pb). Após nova digestão e purificação foi clonado no vetor de expressão pET102/D-TOPO® (6315 pb), utilizando a enzima *T4ligase* (Promega®), formando a construção pET102/D-TOPOgE.

2.2 Transformação da *E. coli* e Produção da proteína

Células quimiocompetentes de *E. coli* linhagem DH10B (livre de vetores) foram transformadas com a construção pET102/D-TOPOgE e cultivadas a 37°C em placas contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani: triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) com adição de 15g/L de Agar e Ampicilina (100µg/ml). Colônias que cresceram foram inoculadas em LB líquido a 37°C por 16h, sob agitação constante de 250 RPM. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina e purificação por precipitação proteica e centrifugação (SAMBROOK et al., 1989). A confirmação da clonagem foi realizada por digestão dupla com as enzimas *XhoI* e *XbaI*, e o produto da digestão enzimática foi observado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml) em TAE (Tris Acetado EDTA).

Após a clonagem o DNA plasmidial foi submetido ao sequenciamento com o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1, realizado no *GeneticAnalyzer 3500* (*AppliedBiosystems*® HITACHI).

A construção pET102/D-TOPOgE foi usado na transformação da linhagem BL-21 de *E. coli* para expressão do gene sintético. Clones foram selecionados em placa com meio LB com Ampicilina (LB Amp), conforme descrito. Para a indução do gE, foi realizado pré-inóculo de 10mL sob agitação de 150RPM, à 37°C durante 16h. Em seguida o pré-inóculo foi adicionado à 240mL de meio LB e incubado sob mesmas condições até atingir densidade ótica de 0,5. Para indução foi utilizado o Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,2µg/µL com incubação a 25°C por 4h sob mesma agitação. Ao final da indução as amostras foram centrifugadas à 5.000RPM por 20min à 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 25mL do tampão PBS. Em seguida foi realizada a sonicação com seis pulsos de 30s com intervalos de 1min. Logo após a amostra foi centrifugada a 10.000RPM por 10min a 4°C. O produto final foi armazenado em geladeira (4 - 8°C).

2.3 Imunodeteção da gErec

A imunodeteção da gErec foi realizada pelo *Western blotting*. Para o SDS-PAGE foram utilizados gel separador de 12%, composto por 6mL de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8%, 3,75mL de Tris-HCl 1M/SDS 0,4%, pH 8,8, 50µL de APS 10% (Sigma-Aldrich®), 10µL de TEMED (Sigma-Aldrich®), água MilliQ q.s.p 15mL, e gel concentrador de 5%, composto por 0,65ml de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8%, 1,25mL de Tris-HCl 1M/SDS 0,4% pH 6,8,

25µL de APS 10% (Sigma-Aldrich®), 5µL de TEMED (Sigma-Aldrich®), água do tipo I (ASTM) q.s.p 5mL.

O sobrenadante da indução foi diluído duas vezes em tampão Laemmli 2X (Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas por 8min a 95°C. Foi utilizado o tampão de corrida SDS-PAGE, cuba vertical de eletroforese e fonte de tensão ajustada para 80 V e 30mA por 90min. Logo após, o produto do gel foi transferido para membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride, Millipore®) seguindo o protocolo de Kucinskaite et al. (2007). A membrana foi incubada em PBS-Tween e leite em pó desnatado (LPD) 5% por 1h à temperatura ambiente para o bloqueio. Após três lavagens com PBS-Tween 0,05% foi incubada com mAbs anti-His (Sigma-Aldrich®) diluído na mesma solução de bloqueio (1:3.000), e incubado 16h a 4 – 8°C. Se repetiram as três lavagens da membrana, seguindo com a revelação com *Liquid Substrate System BCIP®/NBT* (Sigma-Aldrich®) em câmara escura por 10min (Goodnough et al., 1993).

2.4 ELISAgErec

O ELISAgErec foi realizado em placas em tiras de 96 poços de alta adsorção (Greiner® Bio-One, Brasil). O antígeno gErec, foi adsorvido em diluições seriadas na solução tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), adicionado 100µL por poço, e a placa foi incubada a 37°C por 2h. Os poços foram bloqueados com leite em pó desnatado 4% em PBS a 37°C por 1h, em seguida lavados três vezes com PBS-T (PBS e 0,1% Tween 20). Os soros foram diluídos 1:20 em PBS-T, 2% LPD, 1% BSA, com 5% do sobrenadante do controle negativo da indução de *E.coli* BL21 contendo o vetor pET102/D-TOPO. Foi adicionado 100µL do soro diluído por poço, e a placa foi incubada a 37°C por 1h, em seguida lavados três vezes com PBS-T. Posteriormente foram adicionados por poço, 100µL da Proteína G peroxidase (Sigma®Aldrich) diluída 1:100.000 em PBS-T, 2% LPD, 1% BSA, e a placa foi incubada a 37°C por 45min. Em seguida os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T, e a revelação foi realizada com 50µL de TMB (Sigma-Aldrich®) por 5min e interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em comprimento de onda de 450nm, e os cálculos realizados em Excel®.

Para os cálculos da estimativa da sensibilidade e da especificidade diagnósticas do ELISAgErec, com relação à virusneutralização e à ELISA comercial, o número mínimo de amostras positivas (n = 138) e negativas (n = 138) necessário foi determinado conforme a fórmula $n \geq z^2 \cdot p \cdot (1-p) / e^2$ (Banoo et al., 2010), considerando: z = 2,58 para 95% de intervalo de

confiança; $p = 0,90$ (para 90% de sensibilidade - Se e especificidade - Sp); $e = 0,05$ (5% de erro). Foram utilizados 599 soros suínos, sendo 208 positivos virusneutralização (VN) e 391 negativos em ELISA comercial para detecção de anticorpos anti-gE do HVS1 (HerdCheck Anti-PRV gpI; Idexx Laboratories, Westbrook, ME, USA), realizado conforme instruções do fabricante, sendo 300 oriundas de Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas e 91 de propriedades tecnificadas do estado de Pernambuco. Os soros controles foram compostos pelo pool de sete soros positivos e pelo pool de 10 soros negativos, respectivamente.

Para avaliar a sensibilidade analítica, limite de detecção, foi testado o soro internacional de referência para a DA (ADV-1), que foi obtido de um suíno vacinado contra a DA e inoculado três vezes com a cepa *Kojnock* do HVS1. Deve ser testado na diluição 1:2, onde apresenta a quantidade mínima de anticorpos para avaliar a sensibilidade e o limite mínimo de detecção para testes diagnósticos laboratoriais, como determinado pelo laboratório de referência da OIE (ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané).

Para avaliação da especificidade analítica foram testados: um pool (denominado EOPS 2006) de soros de 23 de animais Livres de Patógenos Específicos (SPF); soro hiperimune (V/00/S/HYT/01) de suíno SPF vacinado com as vacinas comerciais PARVOVAX (Parvovírus Suíno), RUVAX (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), GRIPPOVAX (vírus influenza atenuado) e MYCOPLASME STELLANUME; e soro (V/985/AUJ/001) de suíno SPF vacinado contra a DA com a vacina Suvaxyn Solvay (TK⁻), que possui anticorpo contra a gB do SHV1. O resultado de cada amostra testada no ELISAgErec em densidade ótica (DO), e o ponto de corte do ELISAgEr foi determinado por meio da análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (Metz, 1978; Zweig e Cambell, 1993), considerando o valor da pp que resultou em Se e Sp máximas, e, conseqüentemente maior Índice de Youden (Youden, 1950) e maior área sob a curva ROC (Zhou et al., 2002).

A Se e Sp do ELISAgErec foram calculadas como: $Se = a/(a + c)$; $Sp = d/(b + d)$; a = número de animais verdadeiro positivos (VN), b = número de animais falso positivos; c = número de animais falso negativo; d = número de animais verdadeiro negativo (ELISA Idexx) (Banoo et al., 2010).

2.5 Termoestabilidade da gErec

A proteína recombinante foi armazenada a 4°C para avaliar a sua estabilidade de longa duração. A gErec também foi submetida ao tratamento térmico por aquecimento a 70°C por 30min, resfriamento no gelo por 10min e centrifugada a 12.000 x g por 10min. Em seguida foi

titulada para verificar a manutenção da atividade antigênica e utilizada como antígeno no ELISAgErec.

3. Resultados

O gene gE sintético sofreu otimização dos códons para expressão. Quando avaliado o *codon usage* da *E. coli* com base no sequenciamento dos clones, a sequência gE sintética apresentou diminuição na diferença de 32,81% para 18,67% dos códons (Figura 1).

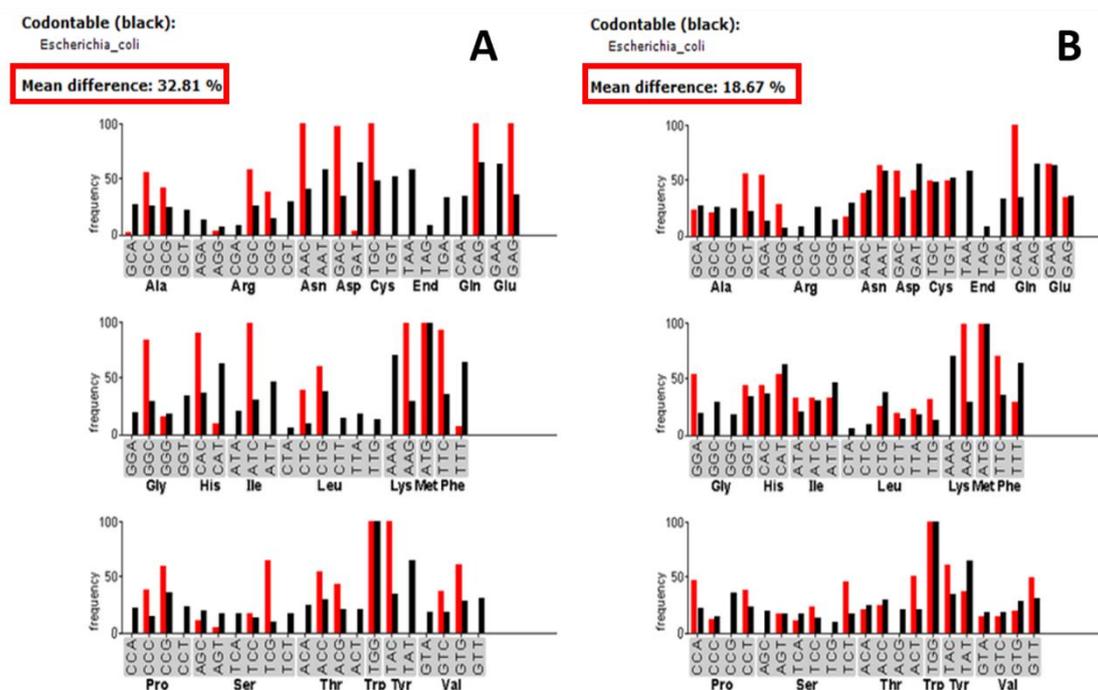


Fig.1. Comparação das sequencias nucleotídicas nativa (A) e códon otimizada (B) com o percentual de diferença nos códons para o *codon usage* de *E. coli* de 32,81% e 18,67%, respectivamente.

A transformação das células *E. coli* DH10B com a construção pET102/D-TOPOgE resultou no crescimento de colônias em placa com meio LB sólido com ampicilina. A construção foi confirmada após a digestão do DNA plasmidial e consequente liberação do inserto e do vetor com os tamanhos esperados, de cerca de 1238pb e 6315pb, respectivamente (Figura 2).

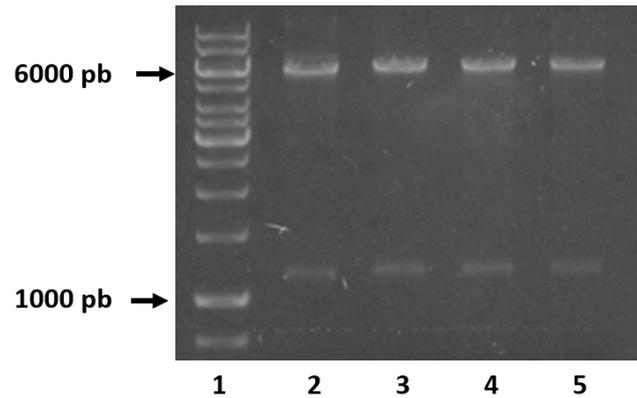


Fig.2. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando o produto da digestão com as enzimas *Xho I* e *Xba I* do DNA plasmidial de quatro colônias (poços do 2 ao 5), e consequente liberação dos fragmentos do vetor pET102/D-TOPO® (6315pb) e da sequência gE (1238pb) (poços do 7 ao 10); marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (poços 1 e 6).

Após extração e purificação do DNA plasmidial dos clones DH10B, a construção pET102/D-TOPOgE foi utilizada na clonagem de *E. coli* da linhagem BL21. O crescimento de colônias em placa com meio LB sólido com ampicilina e posterior digestão do DNA plasmidial confirmaram o sucesso da clonagem. O sequenciamento do DNA plasmidial confirmou a sequência do gene sintético desenhada “in silico”, bem como a correta inserção do gene no vetor pET102/D-TOPO.

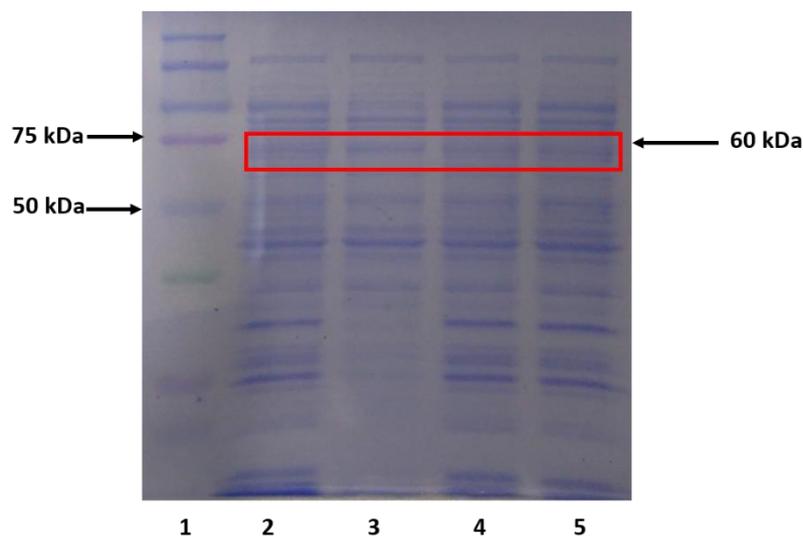


Fig.3. Gel de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (1); Produtos de quatro clones (2, 3, 4 e 5), com a gErec com aproximadamente 60 kDa.

Após a indução, o produto foi analisado em gel de SDS-PAGE e no *western blot*. A imunoreatividade da calda de histidina presente na gErec com o conjugado anti-HIS confirmou a proteína recombinante de aproximadamente 60 kDa (Figuras 3 e 4). Esta proteína se manteve imunorreativa no ELISAgErec após 28 meses estocada a 4°C, bem como após o estresse térmico de 70°C, sem variação no título (1:200).

O ELISAgErec foi padronizado por titulações dos principais componentes, obtendo-se as seguintes condições: antígeno 1:200, soro 1:20 e conjugado 1:100.000. Nessas condições, o ponto de corte do ELISAgErec, definido com base na análise da Curva ROC, foi $DO > 0,13$ (Figura 5), com área sob a curva de 0,99 (IC 95% de 0,99 a 1,00; $p < 0,0001$) e índice de Youden de 0,94.

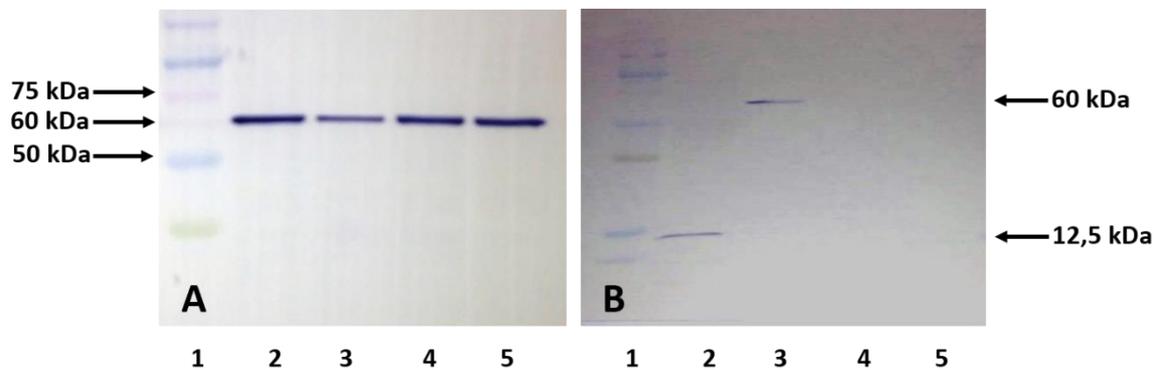


Fig.4. Western Blot com anticorpo anti-His. gErec identificada no produto da indução de quatro clones, com a gErec com aproximadamente 60 kDa (A). (B) controle negativo pET-TOPO (3) e gErec (2), respectivamente; controle negativo pET-TOPO (5) e gErec (4) e, respectivamente, após tratamento térmico a 70°C. 1: Marcador de peso molecular.

O soro de referência OIE (ADV-1) positivo para DA, empregado para determinação da sensibilidade analítica, apresentou, no ELISAgErec, DO de 0,21. Já os demais soros (EOPS 2006, V/00/S/HYT/01 e V/985/AUJ/001), testados para avaliação da especificidade analítica, apresentaram DO de 0,05, 0,06 e 0,06, respectivamente.

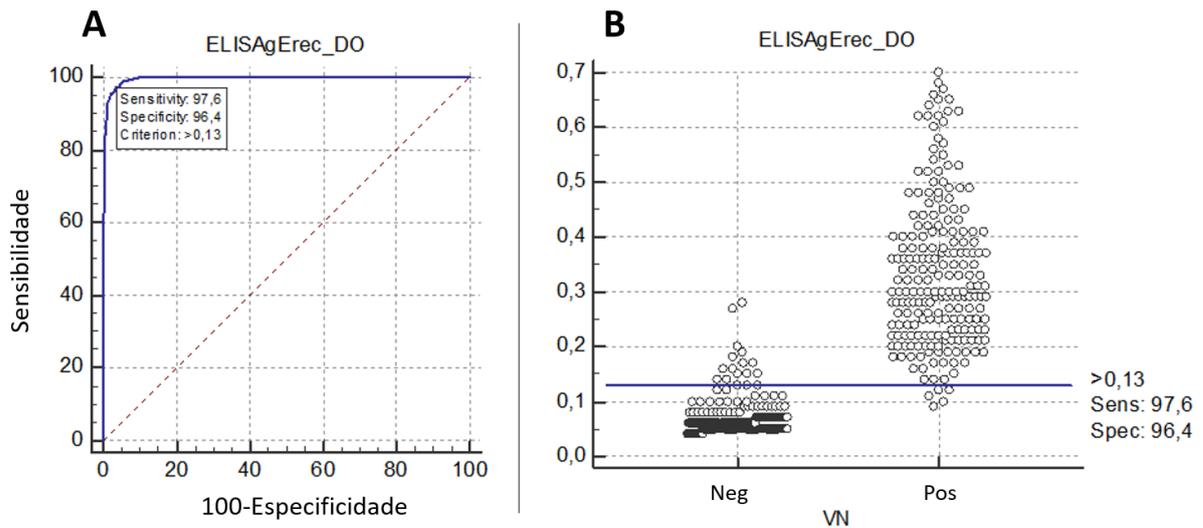


Fig.5. (A) Curva ROC (em azul) do ELISAgErec. (B) Gráfico de dispersão dos soros testes utilizados na avaliação do ELISAgErec. 97,6% de sensibilidade e 96,4% de especificidade no ponto de corte $>0,13$.

O valor do ponto de corte no ELISAgErec que correspondente aos maiores valores de sensibilidade (97,60%) e especificidade (96,42%) foi $DO > 0,13$ (Fig. 5). Já com o ponto de corte $>0,09$, a SeD do teste é de 99,52% e SpD é de 92,33%, e com o ponto de corte $>0,18$, a SeD é de 90,87% e a SpD é de 98,98%.

Tabela 1 – Avaliação das características diagnósticas do ELISAgErec para diagnóstico da Doença de Aujeszky em suínos

		Doença de Aujeszky		Total
		Positivo*	Negativo**	
ELISAgErec	Positivo	203	16	219
	Negativo	5	375	380
Total		208	391	599

* Virusneutralização; ** ELISA HerdCheck Anti-PRV gpI (Idexx Laboratories, Westbrook, ME, USA).

Sensibilidade relativa = 97,60%; Especificidade relativa = 96,42%; ponto de corte $>0,13$.

4. Discussão

Visando obter a gE do HSV-1 recombinante, em sistema de expressão *E. coli*, com alto rendimento e adequada conformação, foi decidido utilizar gene sintético otimizado para o *codon usage* da bactéria hospedeira. O gene da gE possui alto percentual de guanina (G) e citosina (C) (Serena et al., 2013), como também possui códons de difícil tradução por *E. coli*. A utilização de gene sintético otimizado permitiu adequar o gene gE de forma a reduzir esses problemas e facilitar sua expressão. Adicionalmente, o gene sintético, foi recebido inserido em vetor de passagem, com os sítios de restrição definidos para clonagem, o que evitou possíveis erros decorrentes da construção convencional por PCR (Bazan et al., 2009) e corrigiu sequências de difícil amplificação por PCR, como observado por Serena et al. (2013) com o gene gE. Além disso, a clonagem de genes sintéticos requer menos tempo de trabalho e se torna menos custosa do que a clonagem de produtos da PCR. Em outros estudos, o uso de gene sintético, com códons otimizados para *E. coli*, mostrou ser eficiente para melhorar a qualidade da expressão gênica, podendo aumentar de 50 a 100 vezes o nível de produção da proteína heteróloga (Rangwala et al., 1992).

O sistema de expressão usado foi *E. coli*, que é a principal escolha da indústria mundial, pois tem facilidade de manipulação, relativamente baixo custo de cultivo e produção de alta qualidade e quantidade (Demain e Vaishnav, 2009; Jia e Jeon, 2016). A gErec foi produzida com bom rendimento e possível de ser usada em ELISA com alto título, onde com apenas 50µL da gErec é possível testar 94 animais. Em cada etapa de indução da gErec são produzidos 25mL, que são suficientes para testar até 48.000 soros.

O gene parcial da gE já foi clonado e expresso em *E. coli* produzindo proteína recombinante fusionada que foi purificada e utilizada como antígeno em ELISA, apresentando resultados satisfatório quando comparado a um teste comercial que utiliza anticorpo monoclonal (Ni et al., 2004). Por ser glicosilada, a gE, teoricamente, deveria ser produzida usando-se sistemas eucariotos, que realizam modificações pós-traducionais como a glicosilação (Metteleiter, 2000; Dambros et al., 2007). Apesar disto, a gE produzida em baculovírus e *P. pastoris*, (sistemas eucariotos) quando utilizada em ELISAs não foram capazes de distinguir soros positivos dos negativos (Gut et al., 1999; Silva Júnior et al., dados não publicados) ou resultaram em testes de baixas sensibilidade e especificidade (Ao et al., 2003; Serena et al., 2011), evidenciando que apenas a escolha “in silico” do “melhor” sistema de expressão é insuficiente para a obtenção de proteína heteróloga de qualidade para uso em imunodiagnóstico.

Apesar das limitações de *E. coli* em realizar pontes de sulfeto, dobramentos estruturais, glicosilação e outras modificações pós-traducionais que garantam a adequada formação e funcionamento da proteína heteróloga (Daly e Hearn, 2005), com a estratégia adotada neste trabalho foi possível obter a gErec altamente imunorreativa e estável, capaz de distinguir com boa relação P/N soros de animais infectados dos sadios, que foi evidenciado com as altíssimas sensibilidade e especificidade.

O *western blot* demonstrou a presença da gErec com aproximadamente 60kDa, através do uso de anticorpo anti-His para identificar a calda de polihistidina. A mesma porção da gE foi produzida glicosilada e apresentou no *imunoblot* tamanho entre 50 e 60kDa (Sebastian et al., 2008). O tamanho esperado para a gErec foi de 62,5kDa, este tamanho compreende 50kDa da gE que foi produzida em sistema procarioto que não adiciona os sítios de glicosilação, mais 12,5kDa referente à tiorredoxina. A gErec fusionada à tiorredoxina foi testada no ELISA, e os resultados comprovaram sua imunorreatividade e especificidade.

A avaliação da gErec após tratamento a 70 °C comprovou sua estabilidade em situação extrema de estresse térmico, e ainda resultou na diminuição do *background* e melhor discriminação entre soros positivos e negativos. Após o esse tratamento, a gErec não foi detectada no *western blot* com anticorpo anti-His, mas manteve sua imunorreatividade no ELISAgErec no mesmo título anterior ao aquecimento. Este resultado indica que a gErec fusionada à tiorredoxina é termoestável e mantém imunorreativos os seus epítomos, porém, a cauda de histidina não. Este tratamento pode impossibilitar posterior purificação da gErec através da coluna de Níquel já que inativa a cauda de histidina, porém, isto foi irrelevante para este trabalho, pois o protocolo de aquecimento foi suficiente para inibir a imunorreatividade das proteínas de *E. coli* presentes na suspensão antigênica e passíveis de reagir cruzadamente com os soros testes.

Várias proteínas de fusão têm sido usadas como estratégias para conferir atribuições à proteína recombinante que permitem o aumento da produção, solubilidade, estabilidade, purificação por afinidade, imundodeteção e estabilidade conformacional (Kosobokova, Skrypnik e Kosorukov, 2016). O vetor de clonagem e expressão utilizado neste trabalho apresenta o gene da tiorredoxina como proteína de fusão, o promotor T7 que permite a regulação da expressão do gene heterólogo, a cauda de polihistina (6x His). A estratégia de expressar o gene gE fundido ao gene da tiorredoxina deve ter influenciado nas características da proteína obtida, o que favoreceu a solubilidade e a estabilidade em solução, e estabilidade

conformacional quando submetida a altas temperaturas, característica não encontrada nas proteínas da *E. coli*, e que favorece a estrutura secundária e terciária da proteína heteróloga (Bartolucci, et al., 1997), sendo fundamental para a o ELISA (Holmgren, 1985; Sudan, Tewari e Singh, 2015). A característica termoestável da gErec permite sua purificação parcial através de simples protocolos de aquecimento e centrifugação (Lavallie et al., 2000; de Marco et al., 2004; Xu et al., 2016), o que favoreceu os resultados do ELISAgErec apresentando altas sensibilidade e especificidade com a gErec utilizada como antígeno e diluída 200 vezes.

A sequência do gene gE clonada corresponde à porção extramembranar da gE, que tem se mostrado altamente imunoreativa (Ro et al., 1995; Ni et al., 2004; Sebastián et al., 2008). A produção da gErec fusionada à tiorredoxina possibilitou a obtenção da proteína imunorreativa e capaz de identificar anticorpos anti-gE em soro suíno e diferenciar animais vacinados com vacina deletada para o gene gE de animais naturalmente infectados. O antígeno gErec reagiu com o soro DA de referência OIE até o limite de detecção preconizado pelo Laboratório de Referência da OIE. Além disso, no ELISAgErec não foram observadas reações inespecíficas da gErec com soros de suínos vacinados, demonstrando sua alta especificidade analítica, o que é altamente desejável, já que na suinocultura industrial, além de haver circulação de vários agentes infecciosos, o uso de vacinas é uma prática frequente dentre as medidas de biossegurança.

Os cinco animais falsos negativos no ELISAgErec tendem a ser realmente positivos, já que na VN é utilizada a partícula viral completa para identificar anticorpos anti-SHV-1, ampliando assim a sensibilidade do teste quando comparado ao uso de ELISA com apenas uma proteína viral como antígeno. São necessários novos testes destes cinco soros na VN e também no *western blot* para confirmar se são verdadeiros positivos ou se já perderam o título de anticorpos.

Dezesseis soros foram falsos positivos no ELISAgErec, o que pode ser justificado com análise da sensibilidade do ELISA gpI PRV-IDEXX, que foi escolhido como teste ouro para selecionar os soros negativos utilizados neste trabalho. Este é um ELISA comercial indireto competitivo que utiliza mAb conjugado para apenas um ou dois epítomos da gE (Morenkov et al., 1997; Morenkov, Fodor e Fodor, 1999; Wu et al., 2017), o que pode resultar em baixa sensibilidade e conseqüentemente alto número de falsos negativos. Quando testados os 208 soros positivos na VN no ELISA gpI PRV-IDEXX, 33 soros foram falsos negativos e um foi inconclusivo, onde o ELISA comercial resultou em sensibilidade de apenas 83,6%. E este teste

ainda possui baixíssima sensibilidade (44%) para identificar animais nas duas primeiras semanas de infecção (Gut et al., 1999). Portanto, há grande possibilidade dos 16 soros falsos positivos no ELISAgErec serem verdadeiros positivos, necessitando novos testes confirmatórios de VN e *western blot*.

As características diagnósticas do ELISAgErec foram avaliadas, empregando número de amostras calculado para avaliar um teste com SeD e SpD de 90% ou mais. O teste apresentou 97,6% de SeD e 96,4% de SpD. Esses valores estão próximos aos previamente relatados por Gut et al. (1999) (SeD de 99,4% e SpD de 98,4%), Kimman et al. (1996) (SeD de 81% e SpD de 99%), Sebastian et al. (2008) (SeD de 96% e 96%), que produziram epítomos da gE em células de inseto e utilizaram o ELISA gpI- IDEXX como teste padrão ouro, que como demonstrado apresenta baixa SeD o que pode ter influenciado negativamente nos valores de SeD e SpD dos mesmos.

Os resultados do ELISAgErec foram superiores aos de Morenkov et al. (1990) (SeD de 80% e SpD de 90%), Ao et al. (2003) (SeD de 87,5% e 86,7SD de 88,2%), Serena et al. (2011) (SeD de 69,7% e SpD de 86,7%), que utilizaram apenas epítomos expressos em sistemas heterólogos *E. coli*, *P. pastoris* e células de insetos, respectivamente. O uso de apenas um ou alguns epítomos da gE pode prejudicar a SeD permitindo muitos animais falso-negativos (Morenkov, Fodor e Fodor, 1999). Um importante desafio encontrado com o uso de proteínas recombinantes em testes diagnósticos, são as proteínas resultantes do sistema hospedeiro que podem provocar reações inespecíficas prejudicando a SpD.

Com os dados obtidos através da análise do ELISAgErec na curva ROC, é possível determinar o ponto de corte que mais se adequa ao objetivo esperado com o teste. Em regiões endêmicas, o teste deve ser empregado com a intenção de controlar e erradicar o vírus, ou ainda de prevenir o ingresso de animais positivos em rebanhos livre, e para isso é importante que a SeD teste diagnóstico seja a maior possível, diminuindo o risco de animais falso-negativos. Já em áreas livres da DA o teste deve ser empregado com o interesse de identificar o surgimento do agente no rebanho, e deve ter a maior SpD possível para diminuir as chances de animais falso-positivos (Astudillo e Kantor, 1981; Morenkov, Fodor e Fodor, 1999).

5. Conclusão

O sistema de clonagem e expressão *E. coli* foi eficiente em produzir a proteína recombinante gE do vírus da Doença de Aujeszky fusionada à tiorredoxina, que, quando empregada no ELISAgErec resultou em um ELISA DIVA teste de elevadas sensibilidade (97,60%) e especificidade (96,42%).

Agradecimentos

Este trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (PAPPE - 2012; Proc N° SIN-0059-9.00/12), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Biovetech. Parte dos experimentos foi realizada no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia experimentais (LEMTE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Também teve o apoio do Médico Veterinário Silvio Ricardo Lins, com o fornecimento amostras de sangue suíno após o abate humanitário em matadouro.

Bibliografia

- Ao, J., Wang, J., Chen, X., Wang, X., Long, Q. 2003. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV gE-ELISA. **J Virol Met.** 114, 145–150.
- Astudillo V. M. e Kantor I. N. 1981. El problema de la validez de una prueba diagnostica para uso masivo como procedimiento estadistico de clasificacion. **Bol. Centro Panamericano Fiebre Aftosa.** 43-44, 37-43.
- Banoo, S.; Bell, D.; Bossuyt, P.; Herring, A.; Mabey, D.; Poole, F.; Smith, P. G.; Sriram, N.; Wongsrichanalai, C.; Linke, R.; O'Brien, R.; Perkins, M.; Cunningham, J.; Matsoso, P.; Nathanson, C. M.; Olliaro, P.; Peeling, R. W. e Ramsay, A. 2010. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. The TDR diagnostic evaluation panel. *Nature Reviews Microbiology* 4: S21–S31.
- Bartolucci, S., Guagliardi, A., Pedone, E., De Pascale, D., Caninio, R., Camardella, L., Rossi, M., Nicastro, G., Chiara, C., Facci, P., Mascetti, G. e Nicolini, C. 1997. Thioredoxin from *Bacillus acidocaldarius*: characterization, high-level expression. in *Escherichia coli* and molecular modelling. **Biochem. J.** 328,277-285.
- Bazan, S. B., Chavez, A. A. M., Aires, K. A., Cianciarullo, A. M., Garcea, R. L., Ho, P. L. 2009. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch Virol.** 154, 1609-1617.
- Ben-Porat, T., Demarchi, J. M., Lomniczi, B. e Kaplan, A. S. 1986. Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. **Virol** 154,325-334.
- Ciacchi-Zanella, J. R., Flores, E. F. 1995. Vacinas com marcadores antigênicos contra o Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e o Vírus da Doença de Aujeszky. **Cienc. Rural.** 25, 2, 331-341.
- Daly, R. and Heam, M. T. W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recogn.** 18, 119-138.
- Dambros, R. M. F., Ribeiro, B. M., Aguiar, R. W. S., Schaefer, R., Esteves, P. A. Perecmains, S., Simon, N. L., Silva, N. C., Coldebella, M., Ciacchi-Zanella, J. R. 2007. Clonning and expression of Aujeszky's disease vírus glycoprotein E (gE) in a baculovirus system. **BrazJMicrobiol.** 38, 494-499.
- Deb, R., Chakraborty, S., Veeregowda, B., Verma, A. K., Tiwari, R. e Dhama, K. 2013. Monoclonal antibody and its use in the diagnosis of livestock diseases. **Advances in Bioscience and Biotechnology.** v. 4, p. 50-62.
- Demain, A. L., Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **BiotechnolAdv.** 27, 297-306.
- Fonseca Júnior, A. A. Epidemiologia molecular de amostras brasileiras do vírus da doença de Aujeszky. 2010. 53p. **Dissertação Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.**

- Freuling, C., Muller, T. e Mettenleiter, T. C. 2017. Vaccines against Pseudorabies virus (PRV). **Vet Microbiol.** 206, 3-9.
- Goodnough, M. C., Hammer, B., Sugiyama, H., Johnson, E. A. 1993. Colony immunoblot assay of Botulinal toxin. **Appl Environ Microbiol.** 59, 2339-2342.
- Gut, M., Jacobs, L., Tyborowska, J., Szewczyk, B. e Bienkowska-Szewczyk, K. 1999. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex. **Vet Microbiol.** 69, 239-249.
- Holmgren, A. Thioredoxin. 1985. **Ann Rev Biochem.** 54, 237-271.
- Jia, B. e Jeon, C. O. 2016. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biol.** 6, 8, doi: 10.1098/rsob.160196.
- Kimman, T. G. De Leeuw, O. Kochan, G.; Szewczyk, B. W.; Rooij, E. V.; Jacobs, L.; Kramps, J. A.; Peeters, B. 1996. An Indirect Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using Baculovirus-Expressed Antigen for the Detection of Antibodies to Glycoprotein E of Pseudorabies Virus and Comparison of the Method with Blocking ELISAs. **ClinDiagn Lab Immunol.** 3, 167-174.
- Klupp, B. G., Hengartner, C. J., Mettenleiter, T. C., Enquist, L. W. 2004. Complete, Annotated Sequence of the Pseudorabies Virus Genome. **J Virol.** v. 78, 1, 424-440.
- Kosobokova, E. N., Skrypnik, K. A., Kosorukov, V. S. 2016. Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. **Biochemistry (Moscow).** 81, 3, 187-200.
- Lavallie, E. R. L., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A. e Mccoy, M. 2000. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Met Enzymol.** 326, 322-340. Van Oirschot, J. T. 1999. Diva vaccines that reduce virus transmission. **J Biotechnol.** 20, 73, 195-205.
- Marco, A., Casatta, E., Savaresi, S., e Geerlof, A. 2004. Recombinant proteins fused to thermostable partners can be purified by heat incubation. **Pseudorabies. J Biotechnol.** 107, 125-133.
- Mengeling, W. L., Brockmeier, S. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C. 1997. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. **Vet Microbiol.** 55,49-60.
- Mettenleiter, T. Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999. 2000. **The Veterinary Record.** v. 31, p. 99-115.
- Metz, C. E. 1978. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*, 8:283-298.
- Morenkov, O. S.; Fodor, N. e Fodor; I. 1999. Indirect ELISAs based on recombinant and affinity-purified glycoprotein e of Aujeszky's Disease Virus to differentiate between vaccinated and infected animals. **Acta Vet Hung.** 47, 137-150.

- Morenkov, O. S.; Fodor, N.; Sobko, Y. A.; Fodor, I. 1997. Immunological Characterization of Glycoprotein E of Aujeszky's disease virus. **Vir Res.** 51, 65-79.
- Nauwynck, H.J. 1997. Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. **Vet Microbiol.** 55, 3-11.
- Ni, J. Q., Zhang, C. L., Tong, G. Z., Qiu, H. J., Wang, Y. F. e Tian, Z. J. 2004. Expression of truncated gE gene of pseudorabies virus (PRV) and primary application in differential diagnosis of PRV vaccination and infection. **ChinJ Biotechnol.** 20, 4, 526-531.
- OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines Terrestrial Animals:Chap 2.1.2. Aujeszky's disease. 2012. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.02_AUJESZKYS_DIS.pdf>. Acesso em 15 ago. 2017.
- Rangwala, S. H., Finn, R. F., Smith, C. E., Berberich, S. A. Salsgiver, W. J.Stallings, W. C.; Glover, G. I. e Olins, P. O. 1992. High-level production of active HIV-1 protease in *Escherichia coli*. **Gene.** 122, 263-269.
- Ro, L. H., Lai, S. S., Hwang, W. L., Chou, H. H., Huang, J. N., Chang, E. L., YANG, H. L. 1995. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays. **Am J Vet Res.** 5, 56-61.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harb Lab Press** 800p.
- Sebastián, S. G., Filgueira, D. M. P., Casado, E. G., Nunez, M. C., Ramosa, I. S., Tabarés, E., Escribano, J. M. DIVA. 2008. Diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. **JVirol Met.** 153, 29-35.
- Serena, M. S., Geisler, C., Metz, G. E., Corva, S. G., Mórtoła, E. C., LARSEN, A., Jarvis, D. e Echeverría, M. G. 2013. Expression and purification of Suid Herpesvirus-1 glycoprotein E in the baculovirus system and its use to diagnose Aujeszky's disease in infected pigs. **Protein Expr. Purif.** 90, 1, 1-8.
- Serena, M. S., Metz, G. E., Corva, S. G., Mórtoło, E. C., Echeverría, M. G. 2011. A differential ELISA based on recombinant immunodominant epitopes of the gE gene of SHV-1 in a baculovirus–insect cell system to discriminate between pigs infected naturally with pseudorabies and vaccinated pigs. **J Virol Met.** 171, 388-393.
- Sudan, V. Tewari, A. K. e Singh, H. 2015. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in bovines from Kerala, India using a recombinant surface antigen 1 ELISA. **Biologicals.** 43, 250-255.
- Van Oirschot, J. T. Diva vaccines that reduce virus transmission. 1999. **Journal of Biotechnology.** v. 73, p. 195-205.
- Van Oirschot, J. T., Houwersl, D. J., Rziha, H. J., Moonen, P. J. L. M. 1988. Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. **J Virol Met.** 22, 191-206.

- Van Orischot, J. T., Rziha, H. J., Moonen, P. J. L. M., Pol, J. M. A., Van Zaane, D. 1986. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. **J Gen Virol**. Short communication. 67, 1179-1182.
- Wu, C. Y., Wu, C. W., Liao, C. M., Chien, M. S. e Huang, C. 2017. Enhancing expression of the pseudorabies virus glycoprotein E in yeast and its application in an indirect sandwich ELISA. **J Appl Microbiol**.
- Xu, W., Zhao, Q., Xing, L. e Lin, Z. 2016. Recombinant production of influenza hemagglutinin and HIV-1 GP120 antigenic peptides using a cleavable self-aggregating tag. **Nature**.
- Youden, W. J. 1950. An index for rating diagnostic tests. **Cancer**, 3, 32-35.
- Zhou, X. H., Obuchowski, N. A. e Mcclish, D. K. 2002. Statistical methods in diagnostic medicine. Wiley-Interscience. **Cancer**. 3, 32-35.
- Zweig, M. H. e Campbell, G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clin Chem**. 39, 561-577.