



PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA gp19 COMO ANTIGENO PARA DETECÇÃO DE *Ehrlichia canis*

BRUM, Fernanda Antunes¹; GONÇALES, Relber Aguiar¹; PINTO, Luciano da Silva¹; KNABAH, Paula¹; LEITE, Fabio Pereira Leivas².

¹Deptº de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Cx. Postal 354, Pelotas, RS 96010-900, Brasil. E-mail: fernanda-brum@ig.com.br

²Deptº de Microbiologia e Parasitologia, Professor adjunto, Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

A *Ehrlichia canis* é a responsável pela erliquiose monocítica canina (EMC), doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas. São cocobacilos gram-negativos, de vida intracelular obrigatória (SILVA, 2006), de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos, e para algumas espécies, neutrófilos e células endoteliais (AGUIAR, 2006).

A infecção dos hospedeiros vertebrados por *E. canis* ocorre quando carrapatos infectados se alimentam e sua secreção salivar (ALMOSNY, 2002) infectada com erliquia é inoculada no local da picada (DAGNONE et al., 2001). O período de incubação da EMC é de 8 a 20 dias; a doença apresenta três fases: aguda, subclínica e crônica (DAGNONE et al., 2001). O diagnóstico é realizado através de esfregaços sanguíneos, métodos sorológicos ou reação em cadeia da polimerase (PCR) (ANDEREG & PASSOS, 1999).

As espécies de *E. canis* podem ser transmitidas para o homem pelo carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (RAMOS, 2005). Recentemente *E. canis*, foi descrita como sendo capaz de causar doença grave em humanos, com casos de óbito principalmente em crianças e idosos (ALMOSNY, 2002).

A proteína gp 19 é um importante antígeno imunodominante, pois induz rápida resposta imunológica nos cães. A similaridade entre as amostras geograficamente distintas sugere que a proteína gp19 possa ser usada para ensaios de

imunoenzimáticos de diagnóstico, bem como em programas vacinais (AGUIAR, 2008).

Este estudo teve como objetivo clonar e expressar a glicoproteína 19 de *Ehrlichia canis* para ser utilizada como imunobiológico, na detecção rápida e precisa desta doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo está sendo realizado no Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia na Universidade Federal de Pelotas.

As amostras de sangue dos cães serão obtidas na soroteca do Laboratório de Parasitologia.

O gene *gp* 19 foi amplificado pela reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*E.c* p19 F, 5'-GTTACACGTTCAAATCATGG-3'..., e *E.c* p19 R, 5'-ATTCTTACGCACAATCACAAC-3'...) previamente descritos (MC BRIDE et al., 2007). Posteriormente, o produto da PCR foi clonado em vetor TOPO 2.1 (InvitrogenTM) e digerido com as enzimas de restrição e purificado com o kit GFX (GE Healthcare, USA), após foi clonado no vetor pAE e inserido em *Escherichia coli* TOP 10 competente por eletroporação. A triagem das colônias foi feita com fenol clorofórmio segundo JOUGLARD et al.(2002). Os clones recombinantes foram replicados e os plasmídeos extraídos conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001).

Dos clones identificados extraiu-se o plasmídeo, o qual foi digerido com as enzimas de restrição para comprovar a presença do inserto. Após seleção dos clones recombinantes contendo o gene ligado ao vetor, este será purificado e inserido por eletroporação na cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, cultivado e induzido para expressar a proteína gp19. A proteína será concentrada, purificada, quantificada e utilizada como antígeno em um teste de ELISA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a amplificação do gene gp19 por reação da polimerase em cadeia (PCR), este gene possui um tamanho aproximado de 600pb.

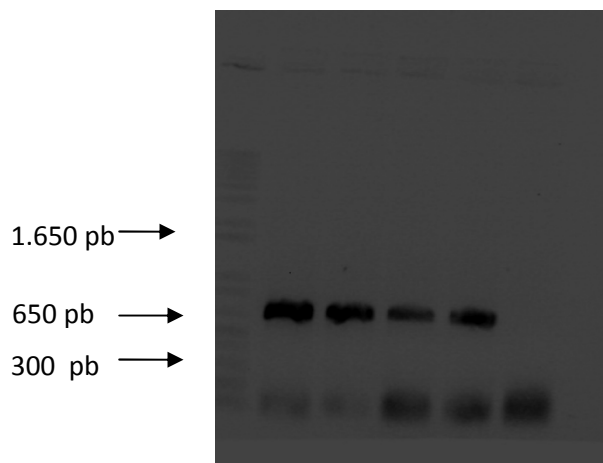


Figura 1: Bandas, na altura de 600 pb, mostrando a amplificação do gene gp19 de *Ehrlichia canis*

A figura 2 apresenta a digestão realizada com as enzimas de restrição, *PstI* e *EcoRI*, mostrando a liberação do inserto e com isso confirmando a presença do mesmo.

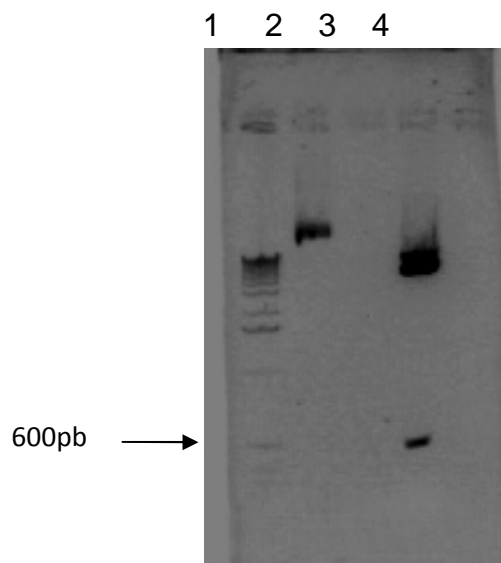


Figura 2: Digestão do gene gp19 de *Ehrlichia canis* do vetor pAE. 1: Marcador de peso molecular 1KB, 2: pAE com o inserto não digerido e 4: pAE digerido com a liberação do inserto.

O seqüenciamento genético foi realizado neste trabalho confirmando a inserção do gene gp19, no vetor.

Trabalho anterior desenvolvido por outro autor (McBRIDE et al., 2007); já havia demonstrado a eficiência das técnicas moleculares aplicadas a clonagem do gene gp19 e sua utilização como diagnóstico específico de *E. canis*, a partir de amostras de DNA, porém os primer utilizados por estes autores são diferentes dos nossos, não havendo então possibilidade de comparação.

4. CONCLUSÃO:

Houve a amplificação do gene gp19, bem como sua transformação, com isso obtivemos a clonagem do gene gp19 de *Ehrlichia canis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGUIAR, D. M.; **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. 2006. 95f. Trabalho de conclusão para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo.
- AGUIAR, D. M.; Erliquiose canina no Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16, 2008. Curitiba. **Anais**.p. 102-105.
- ALMOSNY, N. R. P.; **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e Como Zoonose**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda. 2002, 47-48p.
- ANDREG, P. I.; PASSOS, L. M. F.; Erliquiose Canina – Revisão. **Clinica Veterinária**. n.19, p. 31-39, 1999.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O.; Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.22, n.2,p. 191-201, 2001.
- MC BRIDE, J. W.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; CARDENAS, A. M.; POPOV, V. L.; NETHERY, K. A.; WOODS, M. E.; Identification of a Glycosylated Ehrlichia canis 19-Kilodalton Major Immunoreactive Protein With a Species-Specific Serine- Rich Glycopeptide Epitope. **INFECTION AND IMMUNITY**, v.75, n.1, p.74-82, 2007.
- RAMOS, M.; Erliquiose humana. Disponível em [http: WWW.invivo.fiocruz.br](http://WWW.invivo.fiocruz.br). Acesso: jun. 2007.
- SILVA, L. J.; Riquetsioses no Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, 2006, Ribeirão Preto. **Anais**. p.106-107.