

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Propriedades antigênicas e imunogênicas da região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina expressa em *Escherichia coli*

Maureen Hoch Vieira Fernandes

Pelotas, 2015

Maureen Hoch Vieira Fernandes

Propriedades antigênicas e imunogênicas da região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina expressa em *Escherichia coli*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia de Oliveira Hübner

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo de Lima

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F364p Fernandes, Maureen Hoch Vieira

Propriedades antigênicas e imunogênicas da região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina expressa em *Escherichia coli* / Maureen Hoch Vieira Fernandes ; Silvia de Oliveira Hübner, orientadora ; Marcelo de Lima, coorientador. — Pelotas, 2015.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Expressão. 2. Proteína do nucleocapsídeo. 3. Vírus da cinomose canina. 4. *Escherichia coli*. 5. Imunoglobulina Y. I. Hübner, Silvia de Oliveira, orient. II. Lima, Marcelo de, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Maureen Hoch Vieira Fernandes

Propriedades antigênicas e imunogênicas da região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina expressa em *Escherichia coli*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 03/12/2015

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Silvia de Oliveira Hübner (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
PhD em Ciências Veterinárias pela Universidade de Wisconsin – Madison, USA.

Prof. Dr. Everton Fagonde da Silva
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr.^a Juliana Felipetto Cargnelutti
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria.

Agradecimentos

Aos meus pais, Adriana e Leopoldo, por sempre me incentivarem a seguir os meus sonhos. Pelos ensinamentos e pelo exemplo diário de como ser uma pessoa correta. Amo vocês!

A minha família, principalmente meus irmãos e seus filhos, por serem tão essenciais na minha vida.

A minha prima e amiga Fernanda, por ter vivenciado praticamente todo esse período de mestrado, sempre com palavras de incentivo e me ajudando a extravasar.

As minhas amigas, Caroline, Fabiane e Júlia, por aturarem minhas reclamações constantes e sempre serem otimistas quanto ao meu trabalho.

A minha orientadora professora Silvia, por acreditar em mim e me orientar desde a graduação.

Ao professor Marcelo, meu coorientador, por ter sido fundamental para que este trabalho fosse executado. Não consigo imaginar meu caminho no mestrado sem a sua presença.

Aos meus colegas de pós-graduação e amigos, Clarissa, Débora e Fábio, pela parceria ao longo dos anos.

Aos demais integrantes do Laboratório de Virologia, em especial ao seu Paulo, meu amigão, e à dona Márcia, pela alegria diária.

À doutoranda e amiga Paula, por ter me ensinado tantas coisas e me ajudado na execução deste trabalho. Também aos professores e integrantes do Laboratório 4 e 6 da Biotec, por permitirem que eu realizasse parte do experimento lá.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo

FERNANDES, Maureen Hoch Vieira. **Propriedades antigênicas e imunogênicas da região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina expressa em sistema procarioto.** 2015. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O objetivo deste trabalho foi a expressão da região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose (aa 222-316) em *Escherichia coli* e posterior avaliação de suas propriedades antigênicas e imunogênicas. Para tal, a região conservada do gene da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina (NP CDV) foi selecionada e codón otimizada para expressão em *E. coli*. O gene sintético foi inserido em um vetor pAE e clonado em cepas *E. coli* TOP10F. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* cepa Star e purificada por cromatografia de afinidade. A concentração de proteína obtida após purificação foi aproximadamente 300 mg/mL. A expressão da proteína recombinante NP do CDV (rCDVNP) foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot* utilizando anticorpos monoclonais anti *His tag*. A antigenicidade da rCDVNP foi demonstrada por *Western blot* e ELISA indireto, empregando soros de cães positivos e negativos para cinomose canina. A rCDVNP foi inoculada em galinhas e imunoglobulina Y (IgY) foi purificada a partir da gema de ovo, utilizando o método de delipidação com água destilada acidificada e precipitação com sulfato de amônia. A purificação de IgY foi confirmada por SDS-PAGE e a concentração média de IgY que se obteve foi 28,55 mg/mL. A produção de IgY anti-rCDVNP foi analisada por *Western blot* e ELISA indireto. Os resultados demonstraram que o gene sintético codificante da região conservada da NP do CDV foi clonado com sucesso utilizando o vetor pAE em *E. coli*, resultando posteriormente na expressão de porção da NP na forma recombinante. A rCDVNP demonstrou ser antigênica, uma vez que os soros de cães positivos para cinomose canina reconheceram a proteína. A rCDVNP foi imunogênica após inoculação em galinhas, sendo possível o isolamento e purificação de alta concentração de IgY específica a partir de gema de ovo. Estes resultados sugerem que tanto a rCDVNP quanto a IgY anti-rCDVNP produzida podem ser utilizadas como ferramentas úteis em ensaios de imunodiagnóstico da cinomose canina.

Palavras-chave: expressão; proteína do nucleocapsídeo; vírus da cinomose canina; *Escherichia coli*; imunoglobulina Y.

Abstract

FERNANDES, Maureen Hoch Vieira Fernandes. **Antigenic and immunogenic properties of the conserved region of *Canine distemper virus* nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli***. 2015. 51f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The purpose of this study was the expression of the conserved region of *Canine distemper virus* nucleocapsid protein (aa 222-316) in *Escherichia coli* and subsequent evaluation of its antigenic and immunogenic properties. The conserved region of *Canine distemper virus* nucleocapsid (CDV NP) gene was selected and codon optimized for *E. coli* expression. The synthetic gene was inserted in a pAE vector and cloned into *E. coli* TOP10F strain. The recombinant protein was expressed in *E. coli* Star strain and purified by affinity chromatography. The protein yield after purification was approximately 300 mg/mL. Recombinant CDV NP (rCDVNP) expression was confirmed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis by using His-Tag monoclonal antibodies. The rCDVNP antigenicity was demonstrated by Western blot and ELISA, employing positive and negative CDV dog sera. The rCDVNP was inoculated in hens and immunoglobulin Y (IgY) was isolated and purified from egg yolk, according the delipidation method with acidified distilled water and the precipitation method with ammonium sulfate. The purification of IgY was confirmed by SDS-PAGE and the mean yield of IgY was 28.55 mg/mL. The production of IgY anti-rCDVNP was analyzed by Western blot and ELISA assays. The results showed that the synthetic gene coding the conserved region of the NP CDV was successfully cloned using pAE vector in *E. coli*, resulting in the expression of a recombinant NP. The rCDVNP proved to be antigenic, since distemper positive dog sera recognized the protein. The rCDVNP proved to be immunogenic after inoculation in hens and it was possible to isolate and purify high concentration of specific IgY from egg yolk. These results suggest that both rCDVNP as IgY anti-rCDVNP produced can be used as useful tools in immunodiagnostic assays of canine distemper.

Keywords: expression; nucleocapsid protein; canine distemper virus; *Escherichia coli*; immunoglobulin Y.

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Analysis of rCDVNP expression – Análise da expressão da rCDVNP</i>	28
Figura 2	<i>Reactivity of the rCDVNP with polyclonal serum against CDV – Reatividade da rCDVNP com soro policlonal contra CDV</i>	29
Figura 3	<i>Antigenic properties of rCDVNP by indirect ELISA – Propriedades antigênicas da rCDVNP por ELISA indireto</i>	30
Figura 4	<i>Immunogenicity of rCDVNP – Imunogenicidade da rCDVNP</i>	31
Figura 5	<i>Evaluation of IgY anti-rCDVNP production by indirect ELISA – Avaliação da produção de IgY anti-rCDVNP por ELISA indireto</i>	31

Lista de Abreviaturas e Siglas

bp	Pares de bases
CD	Cinomose canina
CDV	Vírus da cinomose canina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
F	Proteína de fusão
Fig	Figura
H	Hemaglutinina
HC	Cadeia pesada
<i>His tag</i>	Cauda de histidina
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
L	Proteína polimerase viral
LB	Luria Bertani
LC	Cadeia leve
MAb	Anticorpo monoclonal
NP	Proteína do nucleocapsídeo

OD	Densidade óptica
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
P	Fosfoproteína
pAE-NP	Plasmídeo pAE contendo o gene da região conservada da proteína do nucleocapsídeo
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino com 5% de Tween 20
qRT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real
rCDVNP	Proteína recombinante do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

Lista de Símbolos

g	Força centrífuga
h	Hora
Hz	Hertz
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
kDa	QuiloDalton
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
ng	Nanograma
Ni ²⁺	Níquel
nm	Nanometro
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundos
w/v	peso/volume
®	Marca registrada
™	Marca registrada

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µL	Microlitro
µg	Microgramas
µm	Micrometro
~	Aproximadamente

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão da Literatura.....	14
3 Artigo.....	19
4 Considerações Finais.....	39
Referências.....	40
Anexos.....	50

1 Introdução

A cinomose canina é uma das principais doenças que afeta cães, com altas taxas de morbidade e mortalidade (ELIA et al., 2015). A enfermidade possui distribuição mundial, sendo considerada endêmica na população de cães do Brasil (BUDASZEWSKI et al., 2014). Seu agente causador é o vírus da cinomose canina (*Canine Distemper Virus – CDV*), pertencente ao gênero *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae* (ICTV, 2014). Os morbilivírus são vírus envelopados que possuem uma fita simples de RNA que codifica seis proteínas estruturais (McCARTHY et al., 2007).

Dentre as proteínas que compõem o vírion, destaca-se a proteína do nucleocapsídeo (NP), proteína estrutural mais abundante que desempenha um papel essencial na regulação da replicação viral (YUAN et al., 2015). A NP é altamente conservada (STETTLER & ZURBRIGGEN, 1995), e devido as suas características tem sido usada como alvo para detecção em testes de imunodiagnóstico de diversos vírus, tais como os influenzavírus (JI et al., 2011; ZHANG et al., 2014), coronavírus (CHEN et al., 2015; PALANIYAPPAN et al., 2012), bunyavírus (FUKUSHI et al., 2012; LEE et al., 2015), e também para diagnóstico de alguns morbilivírus (RAJ et al., 2008; YADAV et al., 2009), inclusive o vírus da cinomose canina (BARBEN et al., 1999; LATHA et al., 2007a; LATHA et al., 2007b; VON MESSLING et al., 1999).

Esses métodos de diagnóstico utilizados muitas vezes se baseiam no uso de antígenos recombinantes (YADAV et al., 2009). Tradicionalmente, a produção de proteínas virais para uso em testes envolvia propagação e purificação de proteínas virais. No entanto, há muitas dificuldades associadas a esse processo que entram a produção de antígenos (SPENCER et al., 2007). Neste contexto, surge a produção de proteína recombinante em sistemas microbianos, facilitando a expressão e purificação de proteína e permitindo assim a sua caracterização bioquímica e utilização no desenvolvimento de produtos comerciais (ROSANO & CECCARELLI, 2014). Dentre os sistemas de expressão disponíveis, o que utiliza a *Escherichia coli* é o mais amplamente difundido e que apresenta um grande número de ferramentas, o que facilita a expressão da proteína pela sua relativa simplicidade, baixo custo e

obtenção de alta densidade de cultivo rapidamente (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005).

Outra importante ferramenta utilizada em testes de diagnóstico são imunoglobulinas específicas para a detecção ou quantificação de antígenos associados a diferentes técnicas (MUNHOZ et al., 2014). A produção de imunoglobulina Y (IgY) em galinhas, surge como uma fonte alternativa promissora para a produção de grandes concentrações de anticorpos específicos e com elevada afinidade para serem utilizados na imunodetecção e imunodiagnóstico (JINXIN et al., 2015). A aplicação de IgY em ensaios de imunodiagnóstico viral é uma abordagem eficiente, já sendo descrita em diversos estudos realizados (ZHANG et al., 2015; NAFFA et al., 2015).

Neste sentido, a proposta deste trabalho foi a expressão de uma região conservada da NP do CDV em sistema procarioto (*E. coli*) e caracterização da proteína recombinante, além da produção e isolamento de IgY anti-NP em galinhas visando futuramente a elaboração de um ensaio imunodiagnóstico utilizando esses produtos. Por fim, os resultados foram compilados na forma de um artigo intitulado “*Antigenic and immunogenic properties of the conserved region of canine distemper virus nucleocapsid protein expressed in Escherichia coli employing codon optimized synthetic gene*”, que foi submetido ao periódico científico *Journal of Virological Methods*.

2 Revisão da Literatura

2.1 Vírus da cinomose canina

O vírus da cinomose canina (*Canine distemper virus* – CDV) é um patógeno altamente contagioso, causador de uma infecção generalizada em sua forma aguda e localizada no sistema nervoso central em sua forma crônica (BEINEKE et al., 2009). É o agente infeccioso que tem a segunda maior taxa de mortalidade em cães domésticos no mundo, com percentuais inferiores apenas ao vírus da raiva (DEEM et al., 2000). Seu espectro de hospedeiro compreende além de cães, outros animais carnívoros e não carnívoros (ALLDINGER et al., 1993; VAN MOLL et al., 1995; YOSHIKAWA et al., 1989). Da mesma forma como os outros paramixovírus, possui uma arquitetura complexa, que consiste basicamente de um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo e uma proteína matriz (VAN REGENMORTEL et al., 2000). O seu RNA genômico é de fita simples, de sentido negativo, e codifica seis proteínas estruturais: a proteína de fusão (F), a hemaglutinina (H), a fosfoproteína (P), proteína polimerase viral (L) e a proteína do nucleocapsídeo (NP) (ELIA et al., 2006).

Existem diversas linhagens e genótipos do CDV que estão amplamente distribuídos nos continentes (MARTELLA et al., 2007). No Brasil, a cinomose canina é uma doença endêmica, e já foram detectadas duas linhagens diferentes do vírus circulando na América do Sul (BUDASZEWSKY et al., 2014). Testes sorológicos e ensaios histopatológicos demonstraram que o vírus está amplamente difundido na população de cães não vacinados no interior do Rio Grande do Sul (DEZENGRINI et al., 2007; HEADLEY & GRAÇA, 2000). Além disso, outros estudos regionais demonstram que a cinomose canina é a causa mais importante de morte precoce e eutanásia em cães no Brasil (BENTUBO et al., 2007; FIGHERA et al., 2008).

O CDV infecta, inicialmente, tecidos dos sistemas respiratório e digestório, seguido dos tecidos linfáticos adjacentes e difundindo sistemicamente (BEINEKE et al., 2009). A severidade da infecção irá variar de acordo com a virulência da cepa infectante, idade do animal hospedeiro e condição do seu sistema imunológico

(MARTELLA et al., 2008). O resultado, então, pode variar desde uma infecção subclínica uma variedade de sinais clínicos, sendo frequente desenvolver desordens no trato respiratório, gastrointestinal, ocular, nervoso e cutâneo, que podem aparecer de forma simultânea ou sequencial, (MARTELLA et al., 2008; McCARTHY et al., 2007), além de severa leucopenia e perda da capacidade de proliferação dos linfócitos, causando imunossupressão no animal e favorecendo o surgimento de infecções oportunistas (BEINEKE et al., 2009). O sinal tardio mais comum de se observar é a leucoencefalite desmielinizante (LEMPP et al., 2014).

Uma variedade de parâmetros clínicos e técnicas de imunodiagnóstico podem ser realizadas para se chegar a um diagnóstico *ante mortem* definitivo da cinomose canina (ELIA et al., 2015). No entanto, por ser uma doença com caráter imprevisível e curso variável, muitas vezes o diagnóstico final é inconclusivo (FRISK et al., 1999) ou realizado apenas pela observação das manifestações clínicas compatíveis com a infecção (LATHA et al., 2007b). Dentre os testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico estão isolamento viral, imunofluorescência direta (CHENG et al., 2015) e a soroneutralização (JENSEN et al., 2015). Além disso, técnicas moleculares de diagnóstico tais como a RT-PCR e a qRT-PCR, demonstraram alta sensibilidade e especificidade (ELIA et al., 2006; SAITO et al., 2006). Testes de imunocromatografia e ELISA também se mostraram vantajosos por serem rápidos, de fácil execução e com boa sensibilidade (AN et al., 2008; POTGIETER & AJIDAGBA, 1989, SOMA et al., 2003). O diagnóstico *post mortem* geralmente é realizado com achados de necropsia associados com a imunohistoquímica (HEADLEY et al., 2009; LAN et al., 2009).

A prevenção da doença se dá principalmente pelo uso de vacinas (FISCHER et al., 2013). O tratamento dos animais doentes consiste basicamente em terapia de suporte e o uso de antibióticos para evitar o aparecimento de infecções secundárias, visto que não existem drogas antivirais disponíveis comercialmente (MARTELLA et al., 2008). É recomendável ainda que os animais permaneçam em isolamento para evitar a propagação do vírus (LEISEWITZ et al., 2001). O CDV é rapidamente inativado no meio ambiente, no entanto, persiste por mais tempo em ambiente seco e frio, sendo capaz de permanecer viável por várias semanas em temperaturas entre 0 e 4°C (APPEL, 1987). Por isso, indica-se desinfecções e limpezas de rotina no ambiente, visto que o CDV, como os demais vírus envelopados, facilmente são inativados com tais procedimentos (MARTELLA et al., 2008).

2.1.1 Proteína do nucleocapsídeo

A proteína do nucleocapsídeo (NP) está associada com o genoma do CDV, sendo responsável pela proteção do material genético contra a digestão de enzimas (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001). Ela é produzida em grande quantidade nas células do hospedeiro (STETTLER; ZURBRIGGEN, 1995), sendo expressa logo no início do ciclo de replicação viral (LATHA et al., 2007b). A NP é a principal reguladora da replicação do CDV (STETTLER; ZURBRIGGEN, 1995), visto que o complexo formado pela sua associação com o genoma se constitui no substrato para a síntese de RNA durante a transcrição e replicação do material genético (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001).

A NP possui um total de 523 aminoácidos (YOSHIDA et al., 1998) e peso molecular de aproximadamente 60 kDa (MASUDA et al., 2006; SHIN et al., 1997). A proteína tem duas regiões variáveis, a C-terminal, que interage com as proteínas virais L e P e controla a replicação e transcrição do genoma (HORIKAMI et al., 1992), e a N-terminal que interage com o genoma durante o processo de morfogênese da partícula viral (MORGAN et al., 1984). Estas regiões flanqueiam a região mediana que é altamente conservada (STETTLER; ZURBRIGGEN, 1995). A proteína é altamente imunogênica e não apresenta sítios de glicosilação (YUAN et al., 2015).

Por ser uma proteína imunodominante dos morbilivírus, diversos trabalhos utilizaram a NP como alvo em testes de diagnóstico (BALAMURUGAN et al., 2006; YADAV et al., 2009; YU et al., 2006). Da mesma forma, alguns estudos sugerem que a NP do CDV possui alto potencial para ser usada no diagnóstico da cinomose canina (YI & CHENG, 2014; LATHA et al., 2007a; LATHA et al., 2007b), sendo sugerida também como proteína referência na pesquisa de anticorpos em infecções recentes (ELIA et al., 2015).

A NP do CDV já foi expressa em diferentes sistemas, como em baculovírus (VON MESSLING et al., 1999), células Vero (SHIN et al., 1997) e em *Escherichia coli* (BARBEN et al., 1999; LATHA et al., 2007b, YI & CHENG, 2014). Dentre eles, a expressão em *E. coli* se mostrou mais vantajosa, devido a relativa facilidade envolvendo a expressão e purificação de proteínas recombinantes nesse sistema (BARBEN et al., 1999; LATHA et al., 2007, YI & CHENG, 2014).

2.2 Expressão de proteínas em *Escherichia coli*

A escolha do hospedeiro cuja a maquinaria será utilizada para síntese de proteína é uma etapa crucial para o início do processo de expressão de proteínas recombinantes. Dentre os microrganismos disponíveis estão as bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares (ROSANO & CECCARELLI, 2014). A escolha entre um desses sistemas é realizada dependendo do que é requerido para expressão da proteína recombinante (SPENCER et al., 2007). Entretanto, sabe-se que o sistema que utiliza *E. coli* é o mais amplamente utilizado para investigações laboratoriais (PAPANEOPHYTOU & KONTOPIDIS, 2014).

A maioria dos pesquisadores utilizam *E. coli* principalmente pelo vasto conhecimento que já existe sobre a sua biologia, ferramentas disponíveis, além da facilidade de cultivo, produzindo boas concentrações de proteínas codificadas pelos genes clonados (LAVALLIE, 2001). No entanto, existem fatores desfavoráveis, como por exemplo a incapacidade da *E. coli* de fazer algumas modificações pós-tradução, o que pode prejudicar a especificidade antigênica (SPENCER et al., 2007).

É importante ressaltar que a *E. coli* expressa em altos níveis códons que são comuns a ela, porém se no gene recombinante há códons que são considerados raros para a bactéria, estes são expressos em níveis relativamente baixos (BAESHEN et al., 2015). Uma forma de otimizar essa expressão é a utilização de um DNA sintético, que tem sido frequentemente empregado como uma forma vantajosa na elaboração dos genes codificantes das proteínas alvo (NEWCOMB et al., 2007). Além disso, o emprego de genes sintéticos é compatível com alterações ou substituição de códons do gene original, resultando em uma otimização da expressão no sistema escolhido (WELCH et al., 2009).

2.3 Imunoglobulina Y

A imunoglobulina Y (IgY) é a principal imunoglobulina produzida pelas galinhas (*Gallus domesticus*), sendo continuamente sintetizada e secretada no sangue e transferida para a gema do ovo, onde é acumulada em altas concentrações (MORRISON et al., 2002). É composta por duas cadeias leves (LC – *light chain*) e duas cadeia pesadas (HC – *heavy chain*), sendo as LC (18,660 kDa) e as HC (65, 105 kDa) compostas por regiões variáveis e constantes (SUN et al., 2001). A IgY possui

propriedades distintas que servem como um atrativo para o seu emprego em diversos campos da pesquisa, diagnóstico e terapia (MUNHOZ et al., 2014). Dentre elas, destacam-se o bem-estar animal, pois há uma redução no uso de animais e menor invasibilidade; o custo, visto que o processo de isolamento de imunoglobulinas é econômico, de alto rendimento, simples e rápido; além disso, IgY não reage de forma cruzada com receptores da porção Fc ou ativa o sistema complemento, reduzindo assim resultados falsos positivos em testes diagnóstico (KARLSSON et al., 2004).

Existem diversas técnicas já descritas para o isolamento de IgY da gema de ovo, e elas podem ser usadas individuais ou em combinação, dependendo da quantidade, da atividade biológica requerida e da pureza que se pretende obter (SCHADE et al., 2001). Durante a primeira etapa do isolamento ocorre um processo de delipidação, que consiste na extração de lipídios solúveis e lipoproteínas (KO & AHN, 2007). Para tal, são empregados métodos que utilizam, por exemplo, água destilada acidificada (AKITA & NAKAY, 1992), polietilenoglicol (POLSON, 1990) e xantana (HATTA & KIM, 1990). Na segunda etapa do processo (a separação das imunoglobulinas), em geral utilizam-se métodos que podem ser divididos em três principais grupos: métodos de precipitação, métodos cromatográficos e de ultrafiltração (GUIMARÃES et al., 2008).

Essas imunoglobulinas provenientes de aves possuem uma grande variedade de aplicações nas áreas científicas (SPILLNER et al., 2012). Já foram descritas diversas abordagens terapêuticas em animais e humanos utilizando IgY (TAKEUCHI et al., 2014; SAMPAIO et al., 2014; VEGA et al., 2013). A aplicação de IgY em ensaios de imunodiagnóstico de agentes infecciosos também já foram amplamente descritas em estudos realizados em bactérias (SANIEE & SIAVOSHI, 2015; VASCONCELLOS et al., 2010), protozoários (FERREIRA JÚNIOR et al., 2012) vírus (BENTES et al., 2015; HE et al., 2015; NAFEA et al., 2015), sendo empregadas técnicas como ELISA, imunofluorescência, imunohistoquímica, imunocromatografia. A resposta imune de galinhas com o CDV como antígeno já foi estudada por Schmidt et al. (1989) e Guimarães et al. (2009), sendo possível a produção e purificação de IgY anti-CDV e sugerindo o uso desse tipo de imunoglobulina como uma alternativa para o diagnóstico da cinomose canina.

3 Artigo

Antigenic and immunogenic properties of the conserved region of *Canine distemper virus* nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli* employing codon optimized synthetic gene

FERNANDES, M. H. V.; FINGER, P. F.; CUNHA, R. C.; VARGAS, G. A.;
FISCHER, G.; LIMA, M.; HÜBNER, S. O.

Submetido ao periódico científico *Journal of Virological Methods*

Antigenic and immunogenic properties of the conserved region of *canine distemper virus* nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli* employing codon optimized synthetic gene

ABSTRACT

The purpose of this study was the expression of a conserved region of canine distemper virus nucleocapsid protein (CDV NP) and evaluation its antigenic and immunogenic properties. The target region of CDV NP gene was selected and codon optimized for *E. coli* expression. The recombinant CDV NP (rCDVNP) was expressed in *E. coli* Star strain and purified by Ni²⁺ affinity chromatography column. The expression of rCDVNP was confirmed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis by using His-Tag monoclonal antibodies. The protein yield after purification was approximately 300 mg/mL. The rCDVNP antigenicity was further demonstrated by western blot and ELISA employing positive and negative control dog sera. The rCDVNP was inoculated in hens and immunoglobulin Y (IgY) was purified from the egg yolk and the mean yield of IgY was 28.55 mg/mL. IgY reacted with the recombinant protein as demonstrated by western blot and ELISA assays. In summary, our findings demonstrated that rCDVNP was antigenic since CDV positive dog sera recognized the protein in vitro. Additionally, the rCDVNP proved to be immunogenic in hens and it was possible to isolate a high concentration of specific IgY antibodies from the egg yolk. Taken together, these results indicate that the rCDVNP along with the specific IgY could be useful tools for the canine distemper immunodiagnostic assays.

Keywords: Expression; CDV; NP; IgY.

1. Introduction

Canine distemper virus (CDV) causes a disease known as canine distemper (CD), characterized in acute systemic or chronic nervous infection (Beineke et al., 2009). CD is a worldwide problem and it is associated with high morbidity and mortality (Elia et al., 2015), being considered the second highest fatality rate of any infectious disease, after rabies, in domestic dogs around the world (Deem et al., 2000). In Brazil, previous studies have shown that CD is the most important cause of early death or euthanasia in dogs (Bentubo et al., 2007; Figuera et al., 2008). The disease affects various organs, resulting in respiratory, nervous and gastrointestinal disorders (Martella et al., 2008). It is also associated with severe leukopenia and immunosuppression, favoring opportunistic infections (Beineke et al., 2009).

CDV is a *Morbillivirus* and belongs to the family *Paramyxoviridae* (ICTV, 2014). The genomic RNA of the CDV is single stranded, negative-sense, and encodes six structural proteins: fusion protein (F), hemagglutinin (H), matrix (M), phosphoprotein (P), viral polymerase protein (L) and the nucleocapsid protein (NP) (Elia et al., 2006). The NP has been separated in three regions, the variable N-terminus, the variable C-terminus and the highly conserved middle region (Yoshida et al., 1998). It is produced in abundant amounts by host cells (Stettler and Zurbriggen, 1995) being expressed early during the viral replication cycle (Latha et al., 2007b). A variety of clinical parameters and immunodiagnostic assays can be performed for definitive *ante mortem* diagnosis of CD (Elia et al., 2015). However, due to the unpredictable and variable course of CD, many times the final diagnosis is inconclusive (Frisk et al., 1999) or only based on the clinical manifestations of the dogs (Latha et al., 2007b). The recombinant DNA technology and its application facilitate routine diagnosis of infectious diseases (Balamurugan et al., 2010). Using the recombinant technology, some studies have demonstrated the detection

of the NP or antibodies against NP for the CD diagnosis (Barben et al., 1999; Latha et al., 2007a; Latha et al., 2007b; von Messling et al., 1999).

There are many options to express recombinant proteins depending on the specific requirement (Spencer et al., 2007), however, *Escherichia coli* expression dominates the expression systems and remains the first choice for laboratory investigations (Papaneophytou and Kontopidis, 2014). The expression in *E. coli* is relatively simple and a high yield of protein can be produced (LaVallie, 2001). In order to further optimize protein expression, synthetic DNA have been frequently used providing an advantageous way to obtain genes encoding target proteins. Besides, it is possible to modify the natural gene with the aim of enhancing expression in heterologous hosts (Welch et al., 2009).

In this study, we demonstrated the expression of a conserved region of CDV NP in *E. coli* employing a codon optimized synthetic gene and the evaluation of its antigenic and immunogenic properties *in vitro* and *in vivo*.

2. Materials and methods

All experiments were conducted in accordance with protocols approved by the Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) of the Universidade Federal de Pelotas (Permit Number: 1251-2015).

2.1. Production of recombinant CDV NP (rCDVNP)

2.1.1. Construction of recombinant plasmid containing a codon optimized synthetic gene of CDV NP

All nucleotide sequences of the CDV nucleocapsid gene deposited in GenBank were analyzed and the conserved sequence located in the central region of NP gene was selected for this study (aa 222-316). The CDV NP nucleotide sequence was codon optimized for *E. coli* expression and synthesized by GENONE®. Geneious Pro 4.8.5 and Vector NTI 8 softwares were used for analyses, edition, alignment and optimization of the sequence (Kearse et al., 2012; Lu and Moriyama, 2015). The synthesized gene was inserted into a pAE vector (Ramos et al., 2004) between restriction enzymes *BamHI* and *HindIII* resulting in the pAE-NP recombinant plasmid.

2.1.2. Cloning and expression of the rCDVNP

E. coli TOP10F strain was transformed with pAE-NP by the heat shock method according Froger and Hall (2007). Screening of colonies by electrophoresis in 1% agarose gel was carried out in order to identify the pAE-NP. The recombinant clones were selected and amplified in LB medium (Kasvi®) with ampicillin (100 µg/mL). Thereafter, extraction of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS was performed (Sambrook and Russell, 2006). Subsequently, *E. coli* Star strain was transformed with the recombinant pAE-NP (Froger and Hall, 2007) aiming protein expression. After, transformed cells were immersed into a tube containing LB medium (Kasvi®) with ampicillin (100 µg/mL) and then the culture was incubated overnight at 37 °C with agitation. The overnight culture was diluted 1:10 in LB medium (Kasvi®) containing ampicillin (100 µg/mL) and incubated at 37 °C until to attain the optical density ($OD_{600}=0.6-0.8$). The expression was induced with 0.5 mM of Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG – Sigma USA) for 3 h at 37 °C with agitation for the production of rCDVNP.

2.1.3. Purification and analysis of the rCDVNP

The IPTG induced culture was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. The precipitate was suspended in buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 20 mM Imidazole) with lysozyme (50 mg/mL) and sonicated seven times for 20 s with 60 Hz. The lysate was centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C and then the precipitate was washed three times with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4). The precipitate was suspended in 0.2% N-Lauroylsarcosine buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole and 0.2% (w/v) of N-Lauroylsarcosine) and remained 48 h at 4 °C. After that, the solution was centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C and then the supernatant was collected into a new tube. The recombinant protein was purified with Ni²⁺ affinity chromatography column (HisTrap™ FF, GE Healthcare®). A step gradient of Imidazole was used to elute the bound proteins. Dialysis was carried out in PBS for 24 h at 4 °C. The final yield of purified protein was estimated using Qubit™ fluorometric quantitation (Life Technologies®).

Aliquots, obtained at each stage of rCDVNP expression and purification, were analyzed by 20% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot. Proteins were transferred to 0.45 µm nitrocellulose membrane (BioRad®) which was blocked overnight with 5% skimmed milk in phosphate buffered saline containing Tween 20 (PBS-T20). After five washes with PBS-T, the membrane was incubated with anti His-Tag monoclonal antibodies (Sigma®) at 1:10,000 for 1 h at 37 °C. After removal the unbound antibodies, the membrane was incubated with rabbit anti-mouse IgG conjugated with HRPO (Sigma®) at 1:5,000 for 1 h at 37 °C. After five washing steps, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma®) substrate was added for 5 minutes at room temperature.

2.2. Antigenic evaluation of rCDVNP

2.2.1. Serum samples

Blood samples were collected from the jugular vein via venopuncture from 10 dogs and kept at -20 °C until use. Five serum samples were collected from Bulldog young pups prior to vaccination and used as negative controls. The other five samples were collected from undefined breed dogs (>1year-old) and used as positive controls. The positive or negative antibody status of all serum samples were confirmed by serum neutralization (data not shown).

2.2.2. Reactivity of the rCDVNP

In order to confirm the reactivity of the rCDVNP with polyclonal sera against CDV, western blot was carried out under the same conditions previously described. Pools of positive and negative dog sera were used as primary antibody at 1:20 dilution, overnight at 4 °C. Rabbit anti-dog IgG conjugated with HRPO (Sigma®) was used as secondary antibody at 1:1,000 for 1 h at 37 °C.

2.2.3. Antigenic properties of rCDVNP by Indirect ELISA

Optimal concentrations of rCDVNP, serum samples and conjugated antibodies dilution were obtained by checkboard titrations. Except as otherwise indicated, all incubation steps were performed at 37 °C. Three washings were performed with PBS-T20 between each step. Briefly, microtiter 96-well plates (Costar®) were coated with 100 ng/well of rCDVNP in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6, at 4 °C overnight. Nonspecific binding sites were blocked with 100 µL/well of PBS-T with 5% skimmed milk for 1 h. Serial dilutions (1:2,560-1:40) of dog serum samples were incubated for 2 h (100 µL/well). Later, rabbit anti-dog IgG conjugated with HRPO (Sigma®) at 1:7,500 was incubated for 1 h (100 µL/well). The reaction was visualized by using of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in phosphate citrate buffer (pH 5)

containing 0.2% hydrogen peroxide (50 μ L/well) as substrate after incubation for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 2.5 M H₂SO₄ and the absorbance was read at 492 nm by a microplate reader. Analyses were performed in triplicate.

2.3. Immunogenic evaluation of rCDVNP

2.3.1. Inoculation of rCDVNP in hens

Three laying hens New Hampshire Red 20-weeks-old were kept in individual cages with food and water *ad libitum* throughout the study. The inoculations were performed according Wen et al. (2012) with modifications. Briefly, 100 mg of rCDVNP diluted in PBS were emulsified with an equal volume of incomplete Freund's adjuvant (Sigma®) and inoculated in the pectoral muscles with a final volume of 1 mL distributed at two points. Animals were inoculated three times at intervals of two weeks. Eggs were collected and stored at 4 °C.

2.3.2. Purification of IgY

IgY was isolated according to the water solution method described by Akita and Nakay (1992) with modifications. Briefly, the yolk was separated from the white and 5 mL of yolk were mixed with fresh and cold distilled water 9:1 (distilled water pH 5-5.5). This mixture was incubated for 6 h at 4 °C and centrifuged at 10,000 g for 25 minutes at 4 °C. The supernatant was collected through sterile gauzes. Three-step salt precipitation was performed to purify the IgY in the supernatant in turn. First, ammonium sulfate was added to 50% saturation, this solution was stirred at 4 °C for 30 min. Precipitate was collected by centrifugation at 10,000 g for 15 minutes at 4 °C and dissolved to the original volume of yolk in PBS. Ammonium sulfate was added to 33% saturation and this solution was incubated 15 min and centrifuged as before. This step was

repeated once and the precipitate was solubilized in 1 mL of PBS. Dialysis was carried out in PBS for 24 h at 4 °C. Concentration of purified IgY was measured by Qubit™ fluorometric quantitation (Life Technologies®). The polyclonal antibodies were stored at -20 °C. The purification of IgY were analyzed by 15% SDS-PAGE.

2.3.3. Immunogenicity of rCDVNP

Western blot was carried out under the same conditions employed to confirm the presence of the rCDVNP. Representative samples of IgY isolated from egg yolks (0 and 7 weeks after first inoculation) were used as primary antibody at 1:20 overnight at 4 °C. Rabbit anti-chicken IgY conjugated with HRPO (Sigma®) was used as secondary antibody at 1:5,000 for 2 h at 37 °C.

2.3.4. Evaluation of IgY anti-rCDVNP production by Indirect ELISA

Optimal concentrations of rCDVNP, IgY and conjugated antibodies were obtained by checkboard titration. The evaluation of IgY anti-rCDVNP production was carried out under the same conditions employed to evaluate the antigenic properties of the rCDVNP. Briefly, a microtiter 96-well plate (Costar®) was coated with 100 ng/well of rCDVNP. IgY isolated from yolks at 0, 4, and 7 weeks after first inoculation were used as primary antibodies (1:50) and the secondary antibody used was rabbit anti-chicken IgY conjugated with HRPO (Sigma®) at 1:10,000. Analyses were performed in triplicate.

3. Results

3.1. Production of rCDVNP

3.1.1. Recombinant plasmid pAE-NP

Two hundred and ninety-four base pairs (bp) corresponding to the middle nucleotide sequence of CDV NP were codon optimized, synthesized and directionally cloned into the plasmid pAE, generating the recombinant pAE-NP. Recombinant pAE-NP was successfully amplified in *E. coli* TOP10F. This synthesized region resulted in a deduced amino acid sequence with 100% homology with all others CDV NP deposited in GenBank.

3.1.2. Analysis of rCDVNP expression

The expression of the synthetic gene resulted in a protein of approximately 12 kDa, molecular weight as expected. Poly-histidine tag (6-His tag) was expressed fused to the recombinant protein, which facilitated its purification and it was used for the expression confirmation by anti His-Tag MAb (Fig. 1). After purification, the protein yield was approximately 300 mg/mL.

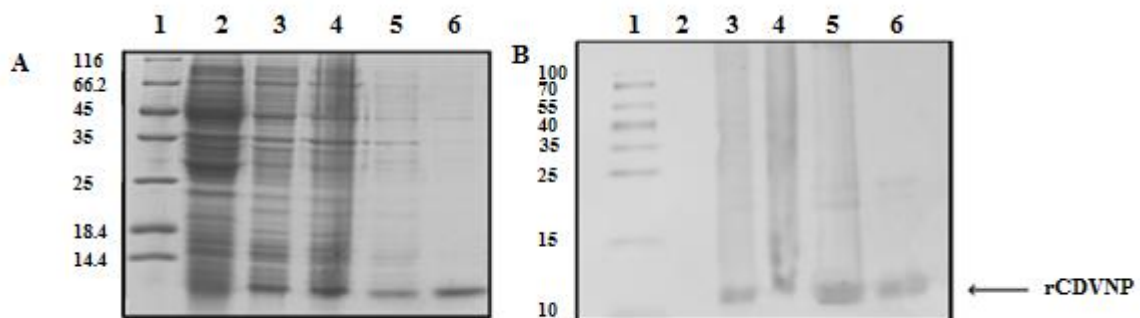


Fig. 1. Analysis of rCDVNP expression. **A** – 20% SDS-PAGE: Lane 1: Pierce™ Unstained Protein MW Marker Thermo Scientific™; Lane 2: *E. coli* star negative control; Lane 3: *E. coli* star transformed with pAE-NP non induced; Lane 4: *E. coli* star transformed with pAE-N induced; Lane 5: rCDVNP solubilized in 0.2% N-lauroylsarcosine; Lane 6: purified rCDVNP. **B** - Western blot: Lane 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder Thermo Scientific™ ; Lane 2: *E. coli* star negative control; Lane 3: *E. coli* star transformed with pAE-NP non induced; Lane 4: *E. coli* star transformed with pAE-N induced; Lane 5: rCDVNP solubilized in 0.2% N-lauroylsarcosine; Lane 6: purified rCDVNP (indicated by arrow).

3.2. Antigenic evaluation of rCDVNP

In order to evaluate the antigenic properties of rCDVNP, western blot and ELISA were performed. Antibodies from seropositive dogs recognized the rCDVNP by western blot as shown in Fig. 2, while no reactivity was observed with sera from the negative control.

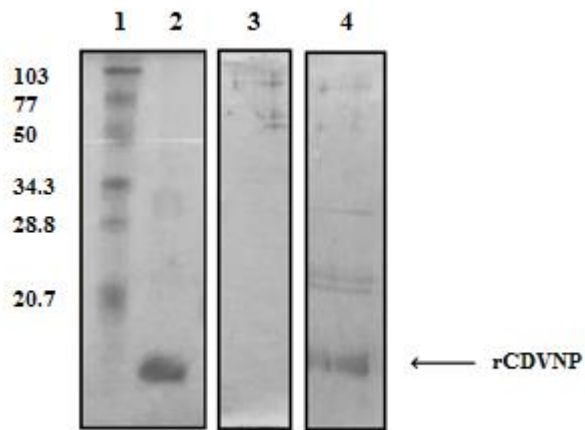


Fig. 2. Reactivity of the rCDVNP with polyclonal serum against CDV. 20% SDS-PAGE: Lane 1: Prestained SDS-PAGE Standards Bio-Rad®; Lane 2: purified rCDVNP; **Western blot:** Lane 3: Dog sera (negative control); Lane 4: dog sera (positive control) (rCDVNP is indicated by arrow).

Reactivity was also observed in indirect ELISA using serial dilutions of positive control sera. Low absorbance values at all dilutions were detected with negative control (Fig. 3).

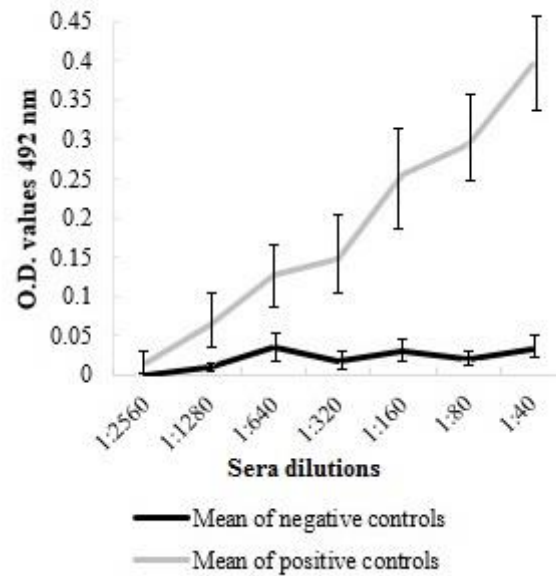


Fig. 3. Antigenic properties of rCDVNP by indirect ELISA. Interaction of antigen-antibody has been evaluated by ELISA using serial dilutions of serum derived from five seropositive and five seronegative dogs against canine distemper. Black line represents the mean of the negative controls optical density (OD) values and the gray line indicates the mean of the positive controls OD. All tests were performed in triplicate.

3.3. Immunogenic evaluation of rCDVNP

3.3.1. Purification of IgY

The presence of IgY was confirmed by 15% SDS-PAGE which revealed two bands of approximately 68 and 27 kDa, respectively, corresponding to the heavy and light chains of IgY (data not show). The mean yield of IgY was 28.55 mg/mL.

3.3.2. Immunogenic response to rCDVNP in hens

Inoculation of laying hens with rCDVNP resulted in a substantial production of specific IgY antibodies. The presence of specific IgY anti-rCDVNP in egg yolks were determined by western blot analysis, in which a strong protein band of the molecular weight protein (~12 KDa)

was identified. This band was detected in egg yolks of hens 7 weeks after the first inoculation, while remained undetectable in egg yolks derived from hens before the inoculations (Fig. 4).

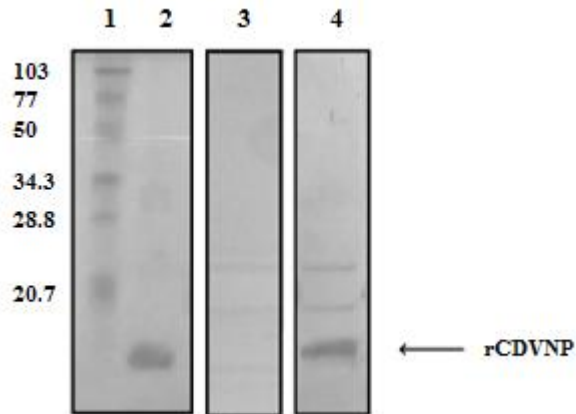


Fig. 4. Immunogenicity of rCDVNP. 20% SDS-PAGE: Lane 1: Prestained SDS-PAGE Standards Bio-Rad®; Lane 2: purified rCDVNP; **Western blot:** Lane 3: Representative sample of IgY purified before the inoculations; Lane 4: Representative sample of IgY purified 7 weeks after first inoculation (rCDVNP is indicated by arrow).

In the figure 5, it is possible to visualize an increasing production of specific IgY anti rCDVNP after inoculations as assayed by indirect ELISA. These findings indicated that the recombinant CDV NP was highly immunogenic in hens.

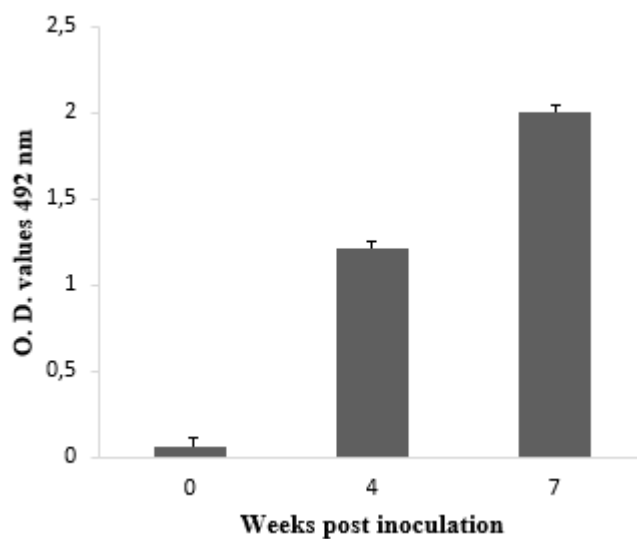


Fig. 5. Evaluation of IgY anti-rCDVNP production by indirect ELISA. ELISA analysis of IgY anti-rCDVNP production with samples isolated at 0, 4 and 7 weeks after the first inoculation.

4. Discussion

Recombinant protein expression technology has the potential to produce a reliable source of antigens for use in diagnostic assays (Spencer et al., 2007). Proteins of CDV, such as H protein (Chan et al., 2009; Cho et al., 2014) and NP (Barben et al., 1999; Latha et al., 2007a; Latha et al., 2007b; von Messling et al., 1999), have been expressed to be used in immunodiagnostic tests. However, the H protein has shown antigenic alterations, since it is most likely to undergo changes under immunological pressure because plays a role in the attachment of the virus to host cells (Iwatsuki et al., 1997). NP is one of the most abundant proteins in CDV infections and the most conserved among morbilliviruses (Stettler and Zurbriggen, 1995). Due its characteristics, NP has been used as viral antigen for diagnosis tests of morbillivirus (Yadav et al., 2009) and also other viruses like influenzavirus (Zhang et al., 2014), coronavirus (Chen et al., 2015) and bunyavirus (Lee et al., 2015).

In the present study, we cloned, expressed and purified the conserved region of CDV NP (amino acids # 222-316) from a synthetic and codon optimized gene for *E. coli* expression. Recombinant CDV NP has already been expressed in different systems such as baculovirus (von Messling et al., 1999) and VERO cells (Shin et al., 1997). The CDV NP expressed either in baculovirus or mammalian cell expression systems were found to be contaminated with cellular or baculovirus proteins resulting in nonspecific reactions (Shin et al., 1997; von Messling et al., 1999). In this study, the rCDVNP was expressed in *E. coli* and the resulting protein was purified successfully.

It has been reported that the production of recombinant proteins in bacteria is simple and more economical when compared to other systems (Yadav et al., 2009). Despite the *E. coli* lack of ability to make post-translational modifications in the expressed protein (Spencer et al., 2007), in this study it seemed do not interfere with the antigen specificity. Using codon optimization

for *E. coli*, CDV NP was expressed from a synthetic gene, thus reducing time and costs when compared to the expression using the native gene (Newcomb et al., 2007). Other studies have also expressed CDV NP efficiently in *E. coli*, but using the native gene cloned from virus isolated from the studied region (Barben et al., 1999; Latha et al., 2007b, Yi and Cheng, 2014). The rCDVNP demonstrated to be antigenic, since CD positive dog sera recognized the protein both in its native and denatured form, without showing nonspecific reactions. In ELISA, antibodies from seropositive dogs recognized rCDVNP even at higher dilutions (Fig. 3). A similar study evaluating the antigenicity of the CDV NP expressed in *E. coli* was demonstrated by Barben et al. (1999), Latha et al. (2007a) and Latha et al. (2007b), in which epitopes of CDV NP also were recognized by antibodies present in dogs by western blot, ELISA and dot-blot assays. NP can be the protein of choice to be used for research of the serological status of recent infections because it is the protein that induces higher antibodies titer in *Morbillivirus* infections (Elia et al., 2015; von Messling et al., 1999).

Our results demonstrated that the rCDVNP expressed in *E. coli* was highly immunogenic in hens and it was possible to obtain high concentrations of specific IgY antibodies from the egg yolk. This methodology represents a promising tool for the production of specific polyclonal antibodies since yolk antibodies are an alternative to mammalian antibodies and desirable from the perspective of animal welfare (Karlsson et al., 2004). Besides, it is economically viable, because the production of IgY is relatively fast and of high yield (Polson et al., 1980), as observed in this study mainly after the second inoculation in hens.

Guimarães et al. (2009) and Schmidt et al. (1989) also examined the immune response of hens inoculated with CDV as antigen observing similar results as showed in this study. The use of IgY to detect viral NP in immunodiagnostic assays is an efficient approach, already described in studies with other viruses (Kammila et al., 2008; Veerasamini et al., 2008).

In summary, the synthetic gene encoding a conserved region of the CDV NP was successfully cloned and expressed in *E. coli* resulting in a recombinant NP protein highly antigenic and immunogenic. Moreover, our results indicated that this approach may be a practical strategy for the large-scale production of specific anti-CDV antibodies to be used in diagnostic tests of CDV.

Acknowledgments

Financial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Akita, E.M., Nakai, S., 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. *J. Food Sci.* 57(3), 629-634.
- Balamurugan, V., Venkatesan, G., Sem, A., Annamalai, L., Bhanuprakash, V., Singh, R.K., 2010. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10(6), 731-753.
- Barben, G., Stettler, M., Jaggy, A., Vandeveld, M., Zurbriggen, A., 1999. Detection of IgM antibodies against a recombinant nucleocapsid protein of canine distemper virus in dog sera using a dot-blot assay. *J. Vet. Med. A* 46, 115-121.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., Baumgärtner, W., 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. Immunop.* 127, 01–18.
- Bentubo, H.D.L., Tomaz, M.A., Bondan, E.F., Lallo, M.A., 2007. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). *Cienc. Rural* 37(4), 1021-1026, 2007.

- Chan, K., Hsieh, H., Wang, H., Lee, Y., Sung, M., Wong, M., Hsu, W., 2009. Identification, expression and antigenic analysis of recombinant hemagglutinin proteins of canine distemper virus. *J. Virol. Methods* 155, 18-24.
- Chen, Y., Chan, K.H., Kang, Y., Chen, H., Luk, H.Kh., Poon, R.W., Chan, J.F., Yuen, K.Y., Xia, N., Lau, S.K., Woo, P.C., 2015. A sensitive and specific antigen detection assay for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerg. Microbes Infect.* 4(4), e26.
- Cho, K., Kim, J., Yoo, H., Kim, D., Park, S., Song, C., Choi, I., Lee, J., 2014. Use of hydrophilic extra-viral domain of canine distemper virus H protein for enzyme-linked immunosorbent assay development. *J. Vet. Sci.* 15(4), 503-509.
- Deem, S.L., Spelman, L.H., Yates, R.A., Montali, R.J., 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo Wildlife Med.* 31(4), 441-451.
- Elia, G., Camero, M., Losurdo, M., Lucente, M.S., Larocca, V., Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2015. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J. Virol. Methods* 213, 127-130.
- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M.S., Lorusso, E., Trani, L.D., Buonavoglia, C., 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 136, 171-176.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Silva, M.C., Brum, J.C., Graça, D.G.; Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesquisa Vet. Brasil.* 28(4), 223-230.
- Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37(11), 3634-3643.
- Froger, A., Hall J.E., 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *JoVE.* 6. Available from: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=253> Accessed in: September, 2015.
- Guimarães, M.C.C., Amaral, L.G., Borges, F.V., Vieira, H.P.L., Matta, C.G.F., Matta, M.F.R., 2009. Characterization of an IgY polyclonal antibodies directed against the canine distemper virus. *Rev. Cienc. Med. Biol.* 8(1), 18-25.
- International Committee On Taxonomy Of Viruses, 2014. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Accessed in: December, 2015.
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Gemma, T., Shin, Y., Mori, T., Hirayama, N., Kai, C., Mikami, T., 1997. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H)

- proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virol.* 78, 373-380.
- Kammila, S., Das, D., Bhatnagar, P.K., Sunwoo, H.H., Zayas-Zamora, G., King, M., Suresh, M.R., 2008. A rapid point of care immunoswab assay for SARS-CoV detection. *J. Virol. Methods* 152, 77-84.
- Karlsson, M., Kolberg, H., Larsson, A., 2004. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World Poultry Sci. J.* 60(3), 341-348.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinform.* 28(12), 1647-1649.
- Latha, D., Geetha, M., Ramadass, P., Narayanan, R.B., 2007a. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. *Vet. Immunol. Immunop.* 119, 278-286.
- Latha, D., Geetha, M., Ramadass, P., Narayanan, R.B., 2007b. Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. *Vet. Microbiol.* 120, 251-260.
- LaVallie, E.R., 2001. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 00:5.1:5.1.1–5.1.8.
- Lee, H., Kim, E.J., Song, J.Y., Choi, J.S., Lee, J.Y., Cho, I.S., Shin, Y.K., 2015. Development and evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody for the diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in bovine sera. *J. Vet. Sci.* Available from: <http://www.vetsci.org/journal/view.html?uid=1043&vmd=Full&> Accessed: October, 2015.
- Lu, G., Moriyama, E.N., 2015. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinform.* 5, 378-388.
- Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, C., 2008. Canine Distemper Virus. *Vet. Clin. North Small Anim. Pract.* 38, 787-797.
- Newcomb, J., Carlson, R., Aldrich, S.C., 2007. Genome synthesis and design futures: implications for the US economy. Cambridge, MA: Bio economic research associates.
- Papaneophytou, C.P., Kontopidis, G., 2014. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. *Protein Expr. Purif.* 94, 22-32.

- Polson, A., von Wechmar, M.B., van Regenmortel, M.H., 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9(5), 475-493.
- Ramos, C.R.R., Abreu, P.A.E., Nascimento, A.L.T.O., Ho, P.L., 2004. A high copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1103-1109.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2006. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. *CSH Protoc.* Jun. 1. DOI: 10.1101/pdb.prot4084.
- Schmidt, P., Hafner, A., Reubel, G.H., Wanke, R., Franke, V., Lösch, U., Dahme, E., 1989. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunohistochemistry. *J. Vet. Med. B* 36, 661-668.
- Shin, Y., Mori, T., Tomonaga, K., Iwatsuki, K., Kai, C., Mikami, T., 1997. Expression of the nucleocapsid protein gene of the canine distemper virus. *J. Vet. Med. Sci.* 59(1), 51-53.
- Spencer, K., Osorio, F.A., Hiscox, J.A., 2007. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. *Vaccine* 25(30), 5653-5659.
- Stettler, M., Zurbriggen, A., 1995. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. *Vet. Microbiol.* 44, 211-217.
- Veerasami, M., Singanallur, N.B., Thirumeni, N., Rana, S.K., Shanmugham, R., Ponselaran, S., Muthukrishnan, M., Villuppanoor, S. A., 2008. Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. *New Microbiol.* 31, 549-554.
- Von Messling, V., Harder, T.C., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I., Haas, L., 1999. Rapid and sensitive detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37(4), 1049-1056.
- Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J.E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshull, J., Gustafsson, C., 2009. Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *Plos One* 4(9), e7002.
- Wen, J., Zhao, S., He, D., Yang, Y., Li, Y., Zhu, S., 2012. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral Res.* 93, 154-159.
- Yadav, V., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Sen, A., Bhanot, V., Venkatesan, G., Riyesh, T., Singh, R.K., 2009. Expression of Peste des petits ruminants virus nucleocapsid protein in prokaryotic system and its potential use as a diagnostic antigen or immunogen. *J. Virol. Methods* 162(1-2), 56-63.

- Yi, L., Cheng, S., 2014. A monoclonal antibody against truncated N protein (aa 277-471) of canine distemper virus. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 33(1), 52-56.
- Yoshida, E., Iwatsuki, K., Miyashita, N., Gemma, T., Kai, C., Mikami, T., 1998. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *Vet. Microbiol.* 59, 237-244.
- Zhang, R.H., Li, C.H., He, W.X., Wang, C.L., Xu, T., Jin, M.L., Chen, H.C., 2014. Development of latex agglutination test with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to swine influenza virus. *Int. Immunopharmacol.* 19(2), 201-205.

4 Considerações Finais

Os resultados deste trabalho demonstraram que foi possível expressar a região conservada da proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina em *E. coli* a partir de um gene sintético códon otimizado. A proteína recombinante resultante, rCDVNP, mostrou-se antigênica, uma vez que os soros de cães positivos para cinomose canina a reconheceram, e imunogênica, visto que induziu após inoculação resposta imune em galinhas, sendo possível o isolamento e purificação de alta concentração de IgY específica a partir de gema de ovo. Foi evidenciado neste estudo que tanto a rCDVNP quanto a IgY anti-rCDVNP produzida podem ser utilizadas como ferramentas úteis em ensaios de imunodiagnóstico da cinomose canina.

Referências

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 629-634, 1992.

ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W.; VAN MOLL, P.; ÖRVELL, C. *In vivo* and *in vitro* expression of canine distemper viral proteins in dogs and non-domestic carnivores. **Archives of Virology**, v. 132, n. 3-4, p. 421–428, 1993.

AN, D. J.; KIM, T. Y.; SONG, D. S.; KANG, B. K.; PARK, B. K. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. **Journal of Virological Methods**, v. 147, p. 244-249, 2008.

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: APPEL, M. J. G. **Virus Infections of Carnivores**. Amsterdã: Elsevier Science Publishers, p. 133-159, 1987.

BAESHEN, M. N.; AL-HEJIN, A. M.; BORA, R. S.; AHMED, M. M. M.; RAMADAN, H. A. I.; SAINI, K. S.; BAESHEN, N. A.; REDWAN, E. M. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 953-962, 2015.

BALAMURUGAN, V.; SEN, A.; SARAVANAN, P.; RASOOL, T. J.; YADAV, M. P.; BANDYOPADHYAY, S. K. SINGH, R. K. Development and characterization of a stable Vero cell line constitutively expressing *Peste des petits ruminants* virus (PPRV) hemagglutinin protein and its potential use as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for serosurveillance of PPRV. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1367-1372, 2006.

BARBEN, G.; STETTLER, M.; JAGGY, A.; VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Detection of IgM antibodies against a recombinant nucleocapsid protein of canine distemper virus in dog sera using a dot-blot assay. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 46, p. 115-121, 1999.

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

BENTES, G. A.; LANZARINI, N. M.; LIMA, L. R.; MANSO, P. P.; DA SILVA ADOS, S.; MOUTA JUNIOR, S. D. A. S.; GUIMARÃES, J. R.; DE MORAES, M. T.; PELAJO MACHADO, M.; PINTO, M. A. Using immunoglobulin Y as an alternative antibody for detection of hepatitis A virus in frozen liver sections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, 577-579, 2015.

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.

BUDASZEWSKY, R. F.; PINTO, L. D.; WEBER, M. N.; CALDART, E. T.; ALVES, C. D. B. T.; MARTELLA, V.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; CANAL, C. W. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**, v. 180, p. 76-83, 2014.

CHEN, Y.; CHAN, K. H.; KANG, Y.; CHEN, H.; LUK, H. KH.; POON, R. W.; CHAN, J. F.; YUEN, K. Y.; XIA, N.; LAU, S. K.; WOO, P. C. A sensitive and specific antigen detection assay for Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 4, e26, 2015.

CHENG, Y.; WANG, J.; ZHANG, M.; ZHAO, J.; SHAO, X.; MA, Z.; ZHAO, H.; LIN, P.; WU, H. Isolation and sequence analysis of a canine distemper virus from a raccoon dog in Jilin Province, China. **Virus Genes**, v. 51, n. 2, p. 298-301, 2015.

DEEM, S. L.; SPELMAN, L. H.; YATES, R. A.; MONTALI, R. J. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 4, p. 441-451, 2000.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 183-189, 2007.

ELIA, G.; CAMERO, M.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M. S.; LAROCCA, V.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. **Journal of Virological Methods**, v. 213, p. 127-130, 2015

ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M. S.; LORUSSO, E.; TRANI, L. D.; BUONAVOGLIA. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 136, p. 171-176, 2006.

FERREIRA JÚNIOR, Á.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACÊDO JÚNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e40391, 2012.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. C.; GRAÇA, D. G.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FISCHER, C. D. B.; IKUTA, N.; CANAL, C. W.; MAKIEJCZUK, A.; ALLGAYER, M. C.; CARDOSO, C. H.; LEHMANN, F. K.; FONSECA, A. S. K.; LUNGE, V. R. Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. **Journal of Virological Methods**, v. 194, p. 39-45, 2013.

FRISK, A. L.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.

FUKUSHI, S.; NAKAUCHI, M.; MIZUTANI, T.; SAIJO, M.; KURANE, I.; MORIKAWA, S. Antigen-capture ELISA for detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. **Journal of Virological Methods**, v. 180, p. 68-74, 2012.

GUIMARÃES, M. C. C.; AMARAL, L. G.; BORGES, F. V.; VIEIRA, H. P. L.; MATTA, C. G. F.; MATTA, M. F. R. Characterization of an IgY polyclonal antibodies directed against the canine distemper virus. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 1, p. 18-25, 2009.

GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G.; GAMA FILHO, R. B. Produção de anticorpos em galinhas. **Revista Perspectivas online**, v. 2, n. 7, p.122-129, 2008.

HATTA, H.; KIM, M. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 54, n. 10, p.2531-2535, 1990.

HEADLEY, S. A.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; BRACARENSE, A. P.; ALFIERI, A. A.; SUMMERS, B. A. Molecular detection of canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official**

publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc., v. 21, n. 5, p. 588-597, 2009.

HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 136-140, 2000.

HE, J.; WANG, Y.; SUN, S.; ZHANG, X. Evaluation of chicken IgY generated against canine parvovirus viral-like particles and development of enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for canine parvovirus detection. **Viral Immunology**, Out. 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/vim.2015.0030>> Acesso em: Novembro de 2015.

HORIKAMI, S. M.; CURRAN, J.; KOLAKOFSKY, D.; MOYER, S. A. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 4901-4908, 1992.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2014. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> Acesso em: Dezembro de 2015.

JENSEN, W. A.; TOTTEN, J. S.; LAPPIN, M. R.; SCHULTZ, R. D. Use of serologic tests to predict resistance to canine distemper virus-induced disease and vaccinated dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, v. 27, n. 5, p. 576-580, 2015.

JI, Y.; GUO, W.; ZHAO, L.; LI, H.; LU, G.; WANG, Z.; WANG, G.; LIU, C.; XIANG, W. Development of an antigen-capture ELISA for the detection of equine influenza virus nucleoprotein. **Journal of Virological Methods**, v. 175, p. 120-124, 2011.

JINXIN, H.; YUAN, W.; SHIQI, S.; XIAOYING, Z. Evaluation of chicken IgY generated against canine parvovirus viral-like particles and development of enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for canine parvovirus detection. **Viral Immunology**, v. 28, n. 9, p. 01-06, 2015.

KARLSSON, M.; KOLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 3, p. 341-348, 2004.

KO, K. Y.; AHN, D. U. Preparation of immunoglobulin y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 400-407, 2007.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, 4^a ed. Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers, 2001, p. 1305-1340.

LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; KIEN, T. T.; HIRAI, T.; HIDAKA, Y.; NAM, N. H. First isolation and characterization of canine distemper virus in Vietnam with the immunohistochemical examination of the dog. **The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 71, n. 2, p. 155-162, 2009.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R. B. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 119, p. 278-286, 2007a.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R. B. Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 251-260, 2007b.

LAVALLIE, E. R. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Current Protocols in Protein Science**, unidade 5.1, p. 5.1.1–5.1.8, 2001.

LEE, H.; KIM, E. J.; SONG, J. Y.; CHOI, J. S.; LEE, J. Y.; CHO, I. S.; SHIN, Y. K. Development and evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody for the diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in bovine sera. **Journal of Veterinary Science**, 2015. Disponível em: <<http://www.vetsci.org/journal/view.html?uid=1043&vmd=Full&>> Acesso em: Outubro de 2015.

LEISEWITZ, A. L.; CARTER, A.; VAN VUUREN, M.; VAN BLERK, L. Canine distemper infections, with special reference to South Africa, with a review of literature. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 72, n. 3, p. 127-136, 2001.

LEMPP, C.; SPITZBARTH, I.; PUFF, C.; CANA, A.; KEGLER, K.; TECHANGAMSUWAN, S.; BAUMGÄRTNER, W.; SEEHUSEN, F. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. **Viruses**, v. 6, p. 2571-2601, 2014.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, p. 787-797, 2008.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M. S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MØLLER, M.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 32-42, 2007.

MASUDA, M.; SATO, H.; KAMATA, H.; KATSUO, T.; TAKENAKA, A.; MIURA, R.; YONEDA, M.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; MIZUMOTO, K.; KAI, C. Characterization of monoclonal antibodies direct against the canine distemper virus nucleocapsid protein. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, p. 157-165, 2006.

MCCARTHY, A. J.; SHAW, M. A.; GOODMAN, S. J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, p. 3165-3174, 2007.

MORGAN, E. M.; RE, G. G.; KINGSBURY, D. W. Complete sequence of the Sendai virus NP gene from a cloned insert. **Virology**, v. 135, n. 1, p. 297-287, 1984.

MORRISON, S. L.; MOHAMMED, M. S.; WIMS, L. A.; TRINH, R.; ETCHES, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 8, p. 619-625, 2002.

MUNHOZ, L. S.; VARGAS, G. D.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P. A.; HÜBNER, S. O. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, 2014.

NAFEA, N. M.; SABBAH, M. A.; AL-SUHAIL, R.; MAHDAVI, A. H.; ASGARY, S. Development of hen antihepatitis B antigen IgY-based conjugate for ELISA assay. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, 2015. Disponível em: <http://www.advbiores.net/temp/AdvBiomedRes41100-5543698_152356.pdf> Acesso em: Novembro de 2015.

NEWCOMB, J.; CARLSON, R.; ALDRICH, S. C. Genome synthesis and design futures: implications for the US economy. Cambridge, MA: **Bio economic research associates**, 2007.

PALANIYAPPAN, A.; DAS, D.; KAMMILA, S.; SURESH, M. R.; SUNWOO, H. H. Diagnostics of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid antigen using chicken immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v. 91, n. 3, p. 636-641, 2012.

PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 22-32, 2014.

POLSON, A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. **Immunological Investigate**, v. 19, n. 3, p. 253, 1990.

POTGIETER, L. N. D.; AJIDAGBA, P. A. Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme linked immunosorbent assays using protein A and monoclonal antibody capture. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**; v., 1, n. 2, p. 110–115, 1989.

RAJ, G. D.; RAJANATHAN, T. M.; KUMAR, C. S.; RAMATHILAGAM, G.; HIREMATH, G.; SHAILA, M. S. Detection of peste des petits ruminants virus antigen using immunofiltration and antigen-competition ELISA methods. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 246-251, 2008.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, artigo 172, 2014.

SAITO, T. B.; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; MORAIS, H. S.; ALFIERI, A. F. Detection of canine distemper virus by reverse-transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 1, p. 116-119, 2006.

SAMPAIO, L. C.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; GRESSLER, L. T.; CAPELETO, D. M.; DE SÁ, M. F.; DE JESUS, F. P.; DOS SANTOS JUNIOR, A. G.; ANCIUTI, A. N.; COLONETTI, K.; STAINKI, D. R.; MONTEIRO, S. G. Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 96-103, 2014.

SANIEE, P; SIAVOSHI, F. Endocytotic uptake of FITC-labeled anti-*H. pylori* egg yolk immunoglobulin Y in *Candida* yeast for detection of intracellular *H. pylori*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, artigo 113, 2015.

SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application**: IgY technology. Berlin Heidelberg New York: Springer Lab Manuals, 2001. 255p.

SCHMIDT, P.; HAFNER, A.; REUBEL, G. H.; WANKE, R.; FRANKE, V.; LÖSCH, U.; DAHME, E. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunohistochemistry. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 36, p. 661-668, 1989.

SHIN, Y. S.; MORI, T.; TOMONAGA, K.; IWATSUKI, K.; KAI, C.; MIKAMI, T. Expression of the nucleocapsid gene of the canine distemper virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 1, p. 51-53, 1997.

SOMA, T.; ISHII, H.; HARA, M.; OHE, K.; HAGIMORI, I.; ISHIKAWA, Y.; TANENO, A. Detection of canine distemper virus antigen in canine serum and its application to diagnosis. **Veterinary Record**, v. 153, p. 499-501, 2003.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetics strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SPENCER, K.; OSORIO, F. A.; HISCOX, J. A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5653-5659, 2007.

SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, p. 313-322, 2012.

STETTLER, M.; ZURBRIGGEN, A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 211-217, 1995.

SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, p. 708-712, 2001.

TAKEUCHI, S.; MOTOHASHI, J.; KIMORI, H.; NAKAGAWA, Y.; TSURUMOTO, A. Effects of oral moisturising gel containing egg yolk antibodies against *Candida albicans* in older people. **Gerodontology**, p. 1-7, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ger.12139/pdf>> Acesso em: Novembro de 2015.

VAN MOLL, P.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W.; ADAMI, M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 193-199, 1995.

VASCONCELLOS, F. A.; COUTINHO, M. L.; SILVA, E. F.; FERNANDES, C. P. H.; MONTE, L. G.; SEYFFERT, N.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. In human blood serum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 259-264, 2010.

VEGA, C. G.; BOK, M.; VLASOVA, A. N.; CHATTHA, K. S.; GÓMEZ-SEBASTIÁN, S.; NUÑES, C.; ALVARADO, C.; LASA, R.; ESCRIBANO, J. M.; GARAICOECHEA, L. L.; FERNANDEZ, F.; BOK, K.; WIGDOROVITZ, A.; SAIF, L. J.; PARREÑO, V. Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 5, e1003334, p. 1-17, 2013.

VON MESSLING, V.; HARDER, T. C.; MOENNIG, V.; RAUTENBERG, P.; NOLTE, I.; HAAS, L. Rapid and sensitive detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1049-1056., 1999.

WELCH, M.; GOVINDARAJAN, S.; NESS, J. E.; VILLALOBOS, A.; GURNEY, A.; MINSHULL, J.; GUSTAFSSON, C. Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 4, n. 9, e7002, 2009.

YADAV, V.; BALAMURUGAN, V.; BHANUPRAKASH, V.; SEN, A.; BHANOT, V.; VENKATESAN, G.; RIYESH, T.; SINGH, R. K. Expression of *Peste des petits ruminants* virus nucleocapsid protein in prokaryotic system and its potential use as a diagnostic antigen or immunogen. **Journal of Virological Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 56-63, 2009.

YI, L.; CHENG, S. A monoclonal antibody against truncated N protein (aa 277-471) of canine distemper virus. **Monoclonal Antibodies Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 33, n. 1, p. 52-56, 2014.

YOSHIDA, E.; IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 237-244, 1998.

YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MATSUBARA, Y.; TSURUOKA, H.; ISHII, M.; SHIROTA, K.; NOMURA, Y.; SUGIYAMA, M.; YAMANOUCHI, K. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). **Veterinary Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 193-205, 1989.

YUAN, B.; LI, X. Y.; ZHU, T.; YUAN, L.; HU, J. P.; CHEN, J.; GAO, W.; REN, W. Z. Antibody study in canine distemper virus nucleocapsid protein gene-immunized mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 3098-3105, 2015.

YU, F.; KHAIRULLAH, N. S.; INOUE, S.; BALASUBRAMANIAM, V.; BERENDAM, S. J.; TEH, L. K.; IBRAHIM, N. S.; ABDUL RAHMAN, S.; HASSAN, S. S.; HASEBE, F.; SINNIHAH, M.; MORITA, K. Serodiagnosis using recombinant Nipah virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3134-3138, 2006.

VAN REGENMORTEL, H. V. M.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTEN, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy**. Seventh report of the International Committee on Taxonomy Viruses. New York: Academic Press, 2000. p. 556-557.

ZHANG, L.; LI, D.; LIU, L.; FANG, J.; XU, R.; ZHANG, G. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for the rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus. **Journal of Virological Methods**, v. 221, p. 39-45, 2015.

ZHANG, R. H.; LI, C. H.; HE, W. X.; WANG, C. L.; XU, T.; JIN, M. L.; CHEN, H. C. Development of latex agglutination test with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to swine influenza virus. **International Immunopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 201-205, 2014

Anexos

Pelotas, 17 de agosto de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Dra. Silvia de Oliveira Hübner

Faculdade de Veterinária

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Diagnóstico do vírus da cinomose canina (CDV) utilizando imunoglobulina Y”**, processo nº23110.001251/2015-54, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 1251-2015**).

Vigência do Projeto: 20/08/2015 a 01/12/2016

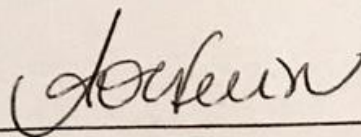
Espécie/Linhagem: *Gallus gallus doemsticus/New Hampshire Red* e *Canis lupus familiaris*

Nº de animais: 3 galinhas e 20 cães

Idade: variável

Sexo: Machos e Fêmeas

Origem: Galinhas – Aviário e Cães – Clínicas Veterinárias



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em 29/09/2015

Assinatura do Professor Responsável: 