

PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA INDIRETO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

**Neida Lucia Conrad¹; Marcelo Mendonça³; Fabricio Rochedo Conceição³,
Ângela Nunes Moreira²**

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico/ Núcleo de Biotecnologia- neidaconrad@yahoo.com.br

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Núcleo de Biotecnologia-angelanmoreira@yahoo.com.br

³Centro de Desenvolvimento Tecnológico/ Núcleo de Biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença aguda, altamente contagiosa, causada por um *Coronavírus*, que acomete a espécie *Gallus gallus domesticus*, infectando células dos aparelhos respiratório e genito-urinário das galinhas (CAVANAGH, 1991). A importância econômica dessa doença decorre da diminuição na produção e qualidade interna e externa dos ovos, da eclodibilidade, da eficiência alimentar e do ganho de peso e do aumento da mortalidade e da condenação de carcaças ao abate, além dos gastos com medicamentos para debelar infecções bacterianas secundárias (MONTASSIER *et al.*, 2008).

O diagnóstico da BIG é baseado no isolamento viral, em conjunto com a sorologia (DI FABIO & ROSSINI, 2000). O uso de anticorpos monoclonais (MAbs) tem colaborado e facilitado o diagnóstico desse tipo de enfermidade, porém seu uso ainda é limitado, pois os MAbs utilizados são importados, elevando o custo de tais metodologias. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa produzirá MAbs contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) para sua utilização em métodos de imunodiagnóstico para esta enfermidade. Entretanto, para a produção de MAbs, é necessário determinar o título de anticorpos dos soros dos animais imunizados, para avaliar se os animais estão soroconvertendo e determinar qual animal será eutanaziado para a fusão entre seus linfócitos B e células de mieloma. Além disso, é necessário fazer o *screening* dos sobrenadantes dos cultivos dos hibridomas, para avaliar se estes estão produzindo anticorpos contra o antígeno utilizado na imunização e se os anticorpos produzidos reconhecem a proteína na sua forma nativa. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar um ELISA indireto para titulação de anticorpos visando a produção de MAbs contra o VBIG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vírus e soros de animais imunizados com VBIG clássica e variante

Foram utilizados a cepa vacinal M41(vírus clássico, 84 mg.ml⁻¹) e o vírus VBIG selvagem (vírus variante, 30 mg.ml⁻¹), fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPISA). As concentrações dos vírus foram determinadas através do *kit* BCA (Ácido Bicínico) conforme indicações do fabricante. Camundongos da linhagem Balb/c com 6 semanas de idade (2 grupos compostos de 3 animais) foram imunizados 10 vezes com 100 µg da cepa vacinal M41 ou com o vírus VBIG selvagem, via intraperitoneal. Na primeira imunização, os vírus foram emulsificados com o mesmo volume de adjuvante de Freund Completo e, nas demais (duas semanas após a primeira e, semanalmente, a partir da 2ª imunização), em adjuvante de Freund Incompleto. Amostras de soro foram obtidas a partir do sangue dos camundongos

coletado 4 dias após a última imunização, por punção do plexo retro-ocular. Os soros coletados foram armazenados a - 20° C.

2.2 Padronização do ELISA Indireto

Para determinar a concentração ideal do antígeno a ser utilizada no ELISA, uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 500, 250, 125 e 62,5 ng/cavidade dos vírus clássico ou variante, diluídos em tampão carbonato bicarbonato (0,05 M, pH 9,6,). As mesmas concentrações de amostras de ovo não infectado foram utilizadas como controle negativo. A placa foi incubada *overnight* a 4 °C. Todas as reações subseqüentes ocorreram por 1 h a 37 °C, os reagentes foram utilizados a um volume de 100 µL/cavidade e após todas as etapas de incubação, as placas foram lavadas, no mínimo, 3 vezes com 200 µL de salina fosfatada tamponada contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T, pH 7,4) por cavidade. Os soros coletados dos animais imunizados foram diluídos 1:100 em PBS-T e aplicados em triplicata às cavidades. Anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:4000 em PBS-T foi adicionado e, após incubação e cinco lavagens da placa, a revelação foi realizada com a adição da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂). Após 15 min no escuro a temperatura ambiente, a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Titertek Multiskan MCC/340), com filtro de 450 nm.

Para determinar a diluição ideal dos soros dos animais imunizados para ser utilizada como controle positivo no ELISA indireto, uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 250 ng/cavidade dos vírus clássico ou variante. A mesma concentração de amostra de ovo não infectado foi utilizada como controle negativo. Os soros dos camundongos imunizados com o vírus clássico ou com o vírus variante foram diluídos em base dois de 1:100 até 1:204800 em PBS-T. Todas as diluições dos soros foram avaliadas em triplicata. As demais etapas do ELISA foram realizadas conforme descrito anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observou-se, no ELISA indireto para a determinação da concentração ideal do antígeno a ser utilizada, que as absorvâncias das reações decresceram proporcionalmente à redução das concentrações dos antígenos (Figura 1). Os resultados apresentados foram obtidos com o soro de um animal imunizado com a amostra viral clássica e de outro imunizado com a amostra variante. Os outros animais de cada grupo apresentaram resultados muito semelhantes (dados não demonstrados).

Independente da concentração de antígenos utilizada na sensibilização, a diferença entre as absorvâncias das reações dos soros com os vírus e com as amostras de ovo não infectado (controle negativo) se manteve. As reações entre os soros e a amostra de ovo não infectada podem ser explicadas pelo fato de o vírus ser produzido artificialmente em ovos não embrionados. Apesar das amostras virais terem sido purificadas, a fim de eliminar as proteínas do ovo, observou-se que uma quantidade relevante destas proteínas ainda permaneceu na amostra, as quais foram, inevitavelmente, inoculadas junto com o vírus. Devido a isso, os animais desenvolveram resposta imune, ou seja, produziram anticorpos contra o vírus e as proteínas do ovo. Assim, no *screening* dos sobrenadantes dos cultivos dos hibridomas, para avaliar se os hibridomas estarão produzindo anticorpos contra o

antígeno viral e se os anticorpos produzidos reconhecerão a proteína na sua forma nativa, as placas deverão ser sensibilizadas também com amostras de ovo não infectado.

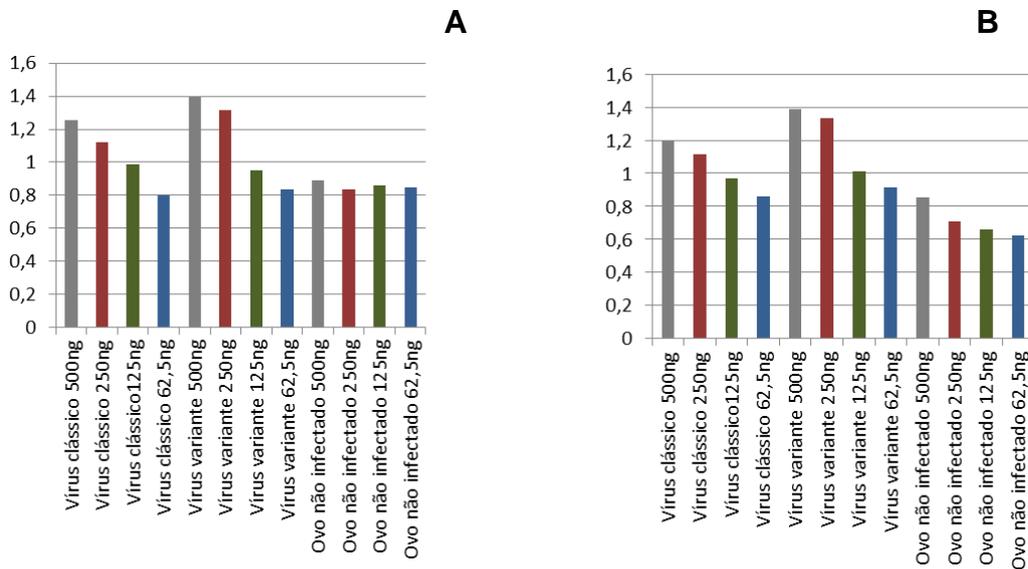


Figura 1. Determinação da concentração ideal de antígeno para o ELISA indireto, utilizando 500, 250, 125 e 62,5 ng/cavidade dos vírus clássico ou variante e os soros coletados de um animal imunizado com o vírus clássico e de outro imunizado com o vírus variante, diluídos 1:100. As mesmas concentrações de amostras de ovo não infectado foram utilizadas como controle negativo. A. Reações entre diferentes concentrações dos antígenos e o soro de um animal imunizado com o vírus clássico. B. Reações entre diferentes concentrações dos antígenos e o soro de um animal imunizado com o vírus variante. O ponto mais elevado de cada barra representa a densidade óptica (D.O., 450 nm) média de triplicatas.

Pode-se observar também que as absorvâncias das reações utilizando ambos os soros foram muito semelhantes, sendo as melhores reações obtidas utilizando o vírus variante, nas concentrações de 500 e 250 ng/cavidade, como antígeno, tanto quando este reagiu com o soro do animal imunizado com o vírus clássico (Figura 1A), quanto com o do imunizado com o vírus variante (Figura 1B). Além disso, a diferença entre as absorvâncias destas reações e das reações dos soros com as amostras de ovo não infectado foi maior.

Na Figura 2 são demonstrados os resultados do ELISA indireto para a determinação da diluição ideal do soro a ser utilizada como controle positivo, obtidos utilizando-se o soro de um animal imunizado com a amostra viral clássica e o de outro imunizado com a amostra variante. Os outros animais de cada grupo apresentaram resultados muito semelhantes (dados não demonstrados).

Pode-se observar que as absorvâncias das reações decresceram proporcionalmente ao aumento da diluição dos soros e que as absorvâncias das reações utilizando o soro do camundongo imunizado com o vírus clássico (Figura 2A) foram levemente superiores às obtidas utilizando o soro do animal imunizado com o vírus variante (Figura 2B).

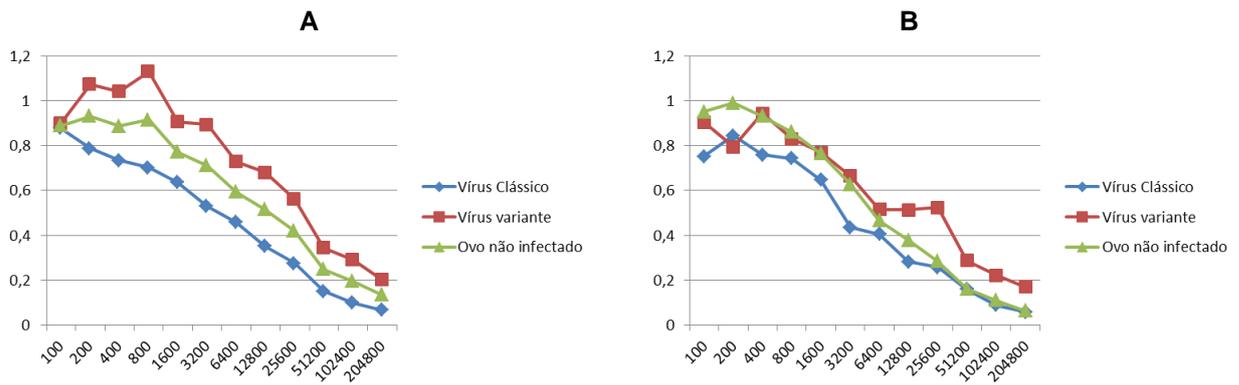


Figura 2. Determinação da diluição ideal dos soros dos animais imunizados (diluídos em base dois de 1:100 até 1:204800 em PBS-T) para ser utilizada como controle positivo no ELISA indireto, utilizando 250 ng dos vírus clássico ou variante como antígeno, por cavidade. A mesma concentração de amostra de ovo não infectado foi utilizada como controle negativo. A. Reações entre os diferentes antígenos e o soro de um animal imunizado com o vírus clássico; B. Reações entre os diferentes antígenos e o soro de um animal imunizado com o vírus variante. Cada ponto representa a D.O (450 nm) média de triplicatas.

Novamente, as melhores reações foram obtidas utilizando o vírus variante como antígeno, tanto quando este reagiu com o soro do animal imunizado com o vírus clássico (Figura 2A), quanto com o do imunizado com o vírus variante (Figura 2B). As absorbâncias das reações dos soros com a amostra de ovo não infectado foram, muitas vezes, maiores do que as obtidas entre os soros e as amostras virais. Entretanto, a diferença entre as absorbâncias das reações de ambos os soros com o vírus variante e das reações dos dois soros com as amostras de ovo não infectado foi maior quando os soros foram diluídos 12800 e 25600 vezes.

4. CONCLUSÕES

A concentração ideal do antígeno viral a ser utilizada no ELISA indireto é de 250 ng/cavidade. As melhores reações foram obtidas utilizando o vírus variante como antígeno. E, embora os camundongos tenham produzido anticorpos contra as proteínas do ovo, quando ambos os soros avaliados foram diluídos 12800 e 25600 vezes, a diferença entre as absorbâncias das reações dos soros com o vírus variante e das reações dos soros com as amostras de ovo não infectado foi maior.

O camundongo imunizado com a cepa viral variante, que apresentar o maior título de anticorpos no ELISA indireto padronizado, será selecionado para a fusão celular e produção de hibridomas secretores de MAbs contra o vírus da bronquite das galinhas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v.38, p. 281-297. 2007.
- DI FABIO, J.; ROSSINI, L.; ORBELL, S.; PAUL, G.; HUGGINS, M.; MALO, A.; SILVA, B.; COOK, J. Characterization of Infectious Bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, v.44, p.582-589, 2000.
- MONTASSIER, M.; MORGAN, V.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L.; MONTASSIER, H. Diversidade do gene da glicoproteína S1 de estirpes do vírus da bronquite infecciosa isoladas no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.221, 2006.