

PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE PARA DETECÇÃO DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*

Silva, G. B. da^{1*}; Caron, L.²; Mores, N.²; Mores, M. A. Z.²; Klein C. S.²; Rebelatto, R.²; Bellaver, F. A. V.

^{1*}Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/ PIBIC. e-mail: gilneibrunosilva@hotmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, Caixa postal 21, Vila Tamanduá, 89700-000 Concórdia SC

Palavras-chave: Imunotestes, ovinos, soro hiperimune.

Introdução

A *Pasteurella multocida* (Pm) pode estar presente em processos pneumônicos e pleurísias em suínos.

Geralmente a produção dos soros hiperimunes é feita por meio da inoculação do microorganismo a ser pesquisado em animais específicos como coelhos obtendo-se uma resposta do sistema imune com a produção de anticorpos. Essa resposta é monitorada por técnicas de imunotestes como, a imunodifusão, soroglutinação em lâmina de microscopia, ELISA entre outras.

Assim, no presente trabalho, foram inoculados ovinos com antígeno de Pm, objetivando a produção de soro hiperimune e posterior utilização em testes de imunohisto-química (IHQ) para detecção de Pm.

Material e Métodos

Identificação da amostra: Foi utilizada uma cepa de Pm tipo A (nº 11246), da Embrapa Suínos e Aves (CNPSA).

Cultivo e inativação da amostra: Foram cultivados 25uL da amostra por 24h a 37°C em 250mL de meio de cultivo *Trypticase Soy Broth* (TSB). Após, foram adicionado 300uL de formaldeído P.A, sendo o material incubado a 37°C por mais 24h para inativação da Pm.

Produção do Ag: O cultivo inativado foi centrifugado a 10000g/45minutos para obtenção de um *pellet*. Posteriormente, foram realizadas três lavagens e novas centrifugações do *pellet* com Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,2 a 12000rpm/30minutos. O *pellet* foi então dissolvido em 25ml de PBS pH7,2 com timerosal (0,2g/L) e armazenado a uma temperatura entre 4º a 8°C. A concentração do antígeno foi ajustada em espectrofotômetro para transmitância de 37%.

Esquema de inoculação de ovinos: O antígeno inativado foi administrado por via intramuscular em 02 ovinos, conforme descrito na tabela 1.

Teste de aglutinação rápida (AR): A técnica de AR foi executada conforme descrito no Manual Bergey's, 1994 (1). Sendo o resultado positivo caracterizado pela presença de grumos.

Teste de aglutinação lenta em tubo (AL): Tal técnica foi realizada conforme descrito no Manual Bergey's, 1994 (1). Sendo o resultado positivo caracterizado pela presença de precipitado no fundo do tubo e sobrenadante límpido. Os resultados negativos são caracterizados por turvação uniforme dos tubos. O título é expresso em função do último tubo com reação positiva.

Técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IGA): Técnica realizada conforme descrito por Turni e Blackall, 2005 (3). Sendo a reação positiva caracterizada por formação de linha de precipitação correspondente a reação antígeno-anticorpo.

Técnica de IHQ: Com o soro hiperimune produzido e testado, utilizando as técnicas citadas acima, foi realizada a técnica de IHQ para Pm padronizada no CNPSA.

Tab. 1. Esquema de inoculação de ovinos.

Dose	Intervalo	Via	Volume	Inóculo
1	Dia zero	SC	1mL	Ag
2	3º dia	SC	1mL	Ag
3	5º dia	SC	1mL	Ag
4	10º dia	IM	2mL	Ag+AIOH
5	15º dia	IM	2mL	Ag+AIOH
6	30º dia	IM	1mL	Ag+ Freund's inc.
7	45º dia	IM	1mL	Ag+ Freund's inc.
8	75º dia	IM	1mL	Ag+ Freund's inc.

Onde: SC)Subcutâneo; IM) Intramuscular; Ag) Antígeno; inc) Incompleto

Resultados e Discussão

Observando os resultados dos imunotestes, que estão demonstrados na Tabela 2, é possível inferir que só houve resposta imune dos ovinos a partir das inoculações de Ag com adjuvante incompleto de Freund's. Assim, recomendamos o ajuste do protocolo do desafio, eliminando as inoculações com Ag inativado complexado ao adjuvante AIOH, que foram descritas na Tabela 1.

Ainda, a Pm foi detectada por IHQ utilizando o soro produzido.

Tab. 2. Resultados dos imunotestes. Entre parêntesis o título de anticorpos detectado.

Coletas	Ovino_2673			Ovino_2674		
	AR	AL	IGA	AR	AL	IGA
A	N	N	N	N	N	N
B	P	P (1:80)	P	P	P (1:160)	P
C	P	P (1:160)	P	P	P (1:160)	P

Onde: N_Negativo; P) Positivo; A) Anterior a 6ª inoculação; B) Anterior a 8ª inoculação e C) 20 dias após a 8ª inoculação

Conclusão

Mesmo com título baixo, o soro foi eficaz para detectar Pm nos tecidos quando utilizado como marcador para IHQ.

Referências

- HOLT, J G.; *et al.* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9º ed.; Williams & Wilkins: USA, 1994.
- QUINTELLA, L. P.; *et al.* **Immunoperoxidase Technique using an anti-Leishmania (L.) chagasi Hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary Leishmaniasis**. São Paulo: Instituto de medicina de São Paulo, 2009. SCIELO.
- TURNI, C.; BLACKALL, P. J. **Comparisons of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis***. Veterinary Microbiology, 24, 839-840, 2000.