



RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS EM JUNDIÁS

AUTOR PRINCIPAL:

Cristian Olivio Nied

E-MAIL:

cristian.nied@hotmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Probic Fapergs

CO-AUTORES:

João Antônio Guizzo, Márcia Bortoluzzi, Tatiana Rohde Pavan, Rafael Frandoloso, Leonardo José Gil Barcellos

ORIENTADOR:

Luiz Carlos Kreutz

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

Piscicultura

UNIVERSIDADE:

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

INTRODUÇÃO:

A piscicultura se constitui em uma alternativa de renda viável para as pequenas propriedades, pois necessita de pouca mão de obra e possibilita intensa produção em áreas pequenas (BARCELLOS, 2006). Há uma expectativa do aumento do consumo per capita nos próximos anos o que suscita a necessidade de pesquisas visando à sanidade dos peixes e, conseqüentemente, a oferta de produto de qualidade. Nas espécies viáveis ao cultivo no Rio Grande do Sul destaca-se o jundiá (*Rhamdia quelen*) por suas características favoráveis ao cultivo, tais como alta prolificidade e bom desenvolvimento, inclusive em cultivo com outros peixes (BARCELLOS, 2012). Um dos principais entraves ao estudo de infecções em peixes é a ausência de insumos e métodos de diagnóstico. Nesse estudo, o principal objetivo foi desenvolver um teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos em jundiás, e verificar a ação imunomoduladora do Parapox Vírus de Ovinos (ORF Vírus) na indução de resposta imune humoral em jundiás.

METODOLOGIA:

O teste imunoenzimático do tipo ELISA foi padronizado para detectar anticorpos no soro de peixe de jundiás seguindo-se protocolos clássicos. Peixes foram imunizados com Albumina Sérica Bovina (BSA) adicionada à diferentes adjuvantes (Adjuvante incompleto de Freund, Parapox Virus de Ovinos), ou apenas BSA sem adjuvante, e o soro dos peixes foi usado para desenvolver o teste ELISA. O teste foi padronizado avaliando-se diferentes concentrações dos seguintes componentes: BSA, soro de peixes imunizados, anticorpo secundário anti IgM de jundiá, anticorpo terciário. Todos os anticorpos foram diluídos em solução salina fosfatada (PBS, pH 7,4, Tween 0,05% e 1% leite desnatado em pó). Após a definição das concentrações ideais, avaliou-se a resposta imune de grupos de peixes imunizados com BSA e os diferentes adjuvantes. Os resultados foram avaliados utilizando-se GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

As concentrações de BSA utilizadas para a adsorção na placa foram de 500; 250; 125; 62,5; 31; 15; 7,5; 3,75; 1,85; 0,9; e 0,4 µg/orifício. Após diversos experimentos determinou-se que a concentração ideal a ser utilizada correspondia a 5 µg de BSA/orifício. Foram testadas as seguintes concentrações para o anticorpo de peixe anti-BSA: 1:100; 1:200; 1:400; 1:600 e 1:800 concluindo que poderia ser usado a menor concentração sem riscos de reações inespecíficas. Para o anticorpo de coelho anti-IgM de jundiá foram testadas as diluições de 1:200; 1:400; 1:600; 1:800; 1:1000; 1:2000 determinando-se que a diluição de 1:1000 foi a mais adequada. Em relação ao anticorpo conjugado cabra anti-coelho, utilizou-se as diluições de 1:10000 e 1:20000, observando-se a concentração ideal de 1:20000.

O teste ELISA foi então utilizado para investigar a ação imunomoduladora (adjuvante) do ORF Vírus na indução da resposta imune humoral em jundiás. Os grupos de peixes imunizados consistiam de jundiás imunizados com PBS (controle negativo), um grupo inoculado somente com BSA (200µg/peixe), outro grupo com BSA+ORF Vírus, outro grupo somente com ORF Vírus e por fim outro grupo inoculado com BSA + Adjuvante incompleto de Freund. A coleta dos soros dos peixes de cada grupo foi feita 30 dias após a inoculação. Os soros foram congelados e utilizados no teste de ELISA. Todos os soros foram testados em duplicata, simultaneamente. Os títulos de anticorpos anti-BSA foram significativamente maiores ($P > 0,05$) nos peixes imunizados com BSA + ORF Vírus em comparação com os títulos de anticorpos em peixes imunizados somente com BSA. Houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos títulos de anticorpos de peixes imunizados com BSA + Adjuvante incompleto de Freund em relação aos demais grupos.

CONCLUSÃO:

O teste ELISA desenvolvido foi eficaz na detecção de anticorpos específicos em jundiás. O ORF Vírus tem ação adjuvante quando usada associado a um antígeno aumentando a resposta imune de forma significativa. O adjuvante incompleto de Freund foi superior ao ORF Vírus da indução de anticorpos específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BARCELLOS, L. J. G. et al. Policultivo de jundiás, tilápias e carpas: uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense. Editora Universidade de Passo Fundo, 1º ed, Passo Fundo, 2006.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Policultivo de jundiás, tilápias e carpas: uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense. Editora Universidade de Passo Fundo, 2º ed, Passo Fundo, 2012.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador