

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Desenvolvimento e validação de ELISA Indireto baseado em LPS para a detecção sorológica de IgGs anti *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo específico

AUTOR PRINCIPAL: Rafaela Luiza Klein

CO-AUTORES: João Antônio Guizzo, Simone Ramos Ribeiro, Luiz Carlos Kreutz

ORIENTADOR: Rafael Frandoloso

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) é uma bactéria Gram-negativa e agente etiológico da pleuropneumonia suína (PS), uma doença respiratória de distribuição mundial que produz importantes perdas econômicas para a cadeia suinícola. O App é classificado fenotipicamente em 16 sorotipos, e no Brasil, infecções produzidas por este patógeno ocorrem em todas as regiões produtoras de suínos, sendo endêmica na região sul, onde os sorovares (SV) 1, 3, 5 e 7 são os mais prevalentes. Uma das fragilidades encontradas para o monitoramento sorológico dos animais é a ausência de kits para diagnóstico nacional deste patógeno. Diante disso, neste estudo, apresentamos o desenvolvimento de um ELISA Indireto baseado no lipopolissacarídeo ultra-purificado de App, com capacidade de identificar suínos com anticorpos reativos a este patógeno.

DESENVOLVIMENTO:

O lipopolissacarídeo (LPS) é um antígeno ancorado na membrana externa de App. O LPS ultra-purificado, há longa data, tem sido utilizado como antígeno em testes que visam a tipificação sorológica de App. Neste estudo, as cepas de App 4074 [sorotipo (SV) 1], K17 (SV5) e WF83 (SV7) foram cultivadas em caldo PPLO a 37°C, em agitação (250 rpm), até atingir uma densidade óptica de 0,7 medida a 600 nm. A continuação, o cultivo foi centrifugado e pellet bacteriano (~ 1g de peso úmido) foi então ressuspenso em 25 ml de PBS estéril e fervido durante 1 hora. Após, o extrato bacteriano foi centrifugado e o sobrenadante coletado, filtrado (0,22 µm) e tratado com proteinase K (1mg/ml) durante 2 horas a 55°C. Posteriormente, o LPS dos SV 1, 5 e 7 foram obtidos através de extração fenólica, coletando-se sempre a fase aquosa, as quais foram dialisadas com água Mili-Q estéril.

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



A comprovação da presença e pureza do LPS purificado foi realizada mediante por eletroforese em gel de poliácridamida 10 % (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata. A continuação, o LPS ultra-purificado foi utilizado para confecção do teste ELISA desenhado para detectar anticorpos suínos anti-App.

Brevemente, placas de ELISA (Polysorp, Nunc) foram sensibilizadas com 250 ng/cavidade de LPS e bloqueadas com 5% de Skim Milk. A continuação, cento e trinta (130) soros suínos foram analisados em três ELISAs independentes confeccionados com LPS extraído do sorovares 1, 5 e 7 de App. Inicialmente, as amostras foram diluídas 1:100 com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de Skim Milk (SM) e 100 ul foram adicionados às placas. A reação foi incubada por 1 hora a 37^o C, e após procede-se 2 lavados com PBS-T, 100 ul de anticorpo secundário de coelhos anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase diluído 1:5.000 com PBS-T foram adicionados a placa. A reação foi novamente incubada a 37^oC por 1 hora e após a reação foi revelada com um substrato contendo TMB. A leitura das placas foi realizada em um leitor de ELISA a 450 nm. Soros hiperimunes de suínos produzidos contra as cepas homólogas foram utilizados como controle positivo, e como controle negativo, utilizou-se PBS + 1% de SM e soro suíno negativo para App.

Neste estudo, demonstramos através de um gel poliácridamida corado com nitrato de prata, que o tratamento com proteínase K combinanda com a extração fenólica é suficiente para obter-se LPS dos SV 1, 5 e 7 com alto grau de pureza. O LPS destes 3 sorotipos rendeu uma única banda de aproximadamente 67 kDa, condizente com o tamanho esperado desta molécula. Durante a validação do teste de ELISA Indireto, observamos ausência de reatividade cruzada entre os 3 LPS. Posteriormente, avaliamos 130 amostras de soros coletados de suínos procedentes de uma granja com histórico de infecção por *A. pleuropneumoniae*. Destas amostras, 21,5% possuíam anticorpos anti-SV1 e 5, 48,4% anti-SV1 e SV7, 21,5 % anti SV7 e 5 e 13 % anti SV 1, 5 e 7 indicado a presente mais de um sorotipo de App dentro uma mesma granja.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Apresentamos aqui o desenvolvimento de um teste de ELISA para o monitoramento sorológico de App em suínos. A detecção do agente e a determinação do sorotipo presente na granja é determinante para seleção do tipo de vacina a ser utilizada no programa preventivo contra esta bactéria. Ainda, o teste pode ser utilizado em granjas que pretendem erradicar o patógeno ou para garantir o status de não portador.

REFERÊNCIAS:

INZANA, T. J.; FENWICK, B. Serologic Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Swine by Capsular Polysaccharide-Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017.

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO
REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



KUCHIISHI, S.S.; CARVALHO, L.F.O.S.; PIFFER, I.A.; KICH, J.D.; RAMENZONI, M.L.F. Padronização de três ELISAs polivalentes com lipopolissacarídeos de cadeia longa dos sorotipos 1 e 5, 2, 3 e 7 ou 10 e 12 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

BOSSÉ, Janine T.; JANSON, Håkan; SHEEHAN, Brian J.; BEDDEK, Amanda J.; RYCROFT, Andrew N.; KROLL, J. Simon LANGFORD, Paul R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 2002

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.

ANEXOS:

Poderá ser apresentada somente uma página com anexos (figuras e/ou tabelas), se necessário.