

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO COM A PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO RECOMBINANTE DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VIRAIS ESPECÍFICOS DOS ISÓTIPOS IGG, IGA E IGM.

Daniel Gomes da Conceição, Hélio José Montassier, Aliandra Maura Gibertoni, Maria de Fátima Silva Montassier, Igor Leonardo dos Santos. – Biológicas – Medicina Veterinária - Departamento de Patologia Animal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI) e causa uma enfermidade aguda e altamente contagiosa em galinhas, afetando de forma mais acentuada os sistemas respiratório e uro-genital desses animais. A infecção pelo VBI está distribuída amplamente em várias regiões do mundo, sendo um patógeno viral cujas consequências da doença por ele produzida, trazem sérios prejuízos econômicos à atividade avícola industrial.

A bronquite infecciosa (BI) é uma das doenças aviárias mais difíceis de serem controladas, pois o VBI se dissemina muito rapidamente entre as aves de uma granja, devido ao curto período de incubação desse vírus (18-48 h) e de sua natureza altamente contagiosa e, em adição a isso, este vírus apresenta alta variabilidade genética e antigênica. O Brasil está entre um dos maiores produtores avícolas em todo o mundo e, tem sido reportado que a Bronquite Infecciosa também causa sérios problemas neste país, especialmente no sudeste do estado de São Paulo e Rio de Janeiro, no sul do estado do Paraná, e no nordeste da Bahia (DI FABIO et al., 2000).

Deve-se salientar que o diagnóstico rápido da infecção pelo VBI, bem como a determinação do estado de imunidade contra esse mesmo vírus em um plantel de aves de criações industriais, são aspectos críticos para se conseguir uma melhor condição de controle da BI. Para tanto, foi comprovado que os testes sorológicos e, dentre estes, os ensaios imunoenzimáticos, quando realizados com padrões apropriados, indicam com elevada acurácia, as concentrações de anticorpos específicos anti-VBI, podendo facilitar a detecção de soro-conversão em aves infectadas ou fazer o monitoramento do estado imunitário em criações com grande número de aves, tal como ocorre na avicultura industrial (MARQUARDT et al., 1981; SNYDER et al., 1983).

Sendo assim, a clonagem e a expressão da proteína N do VBI pode trazer efetivamente algumas vantagens para o preparo de antígenos a serem utilizados em testes sorológicos, principalmente em razão de ser bastante conservada, entre diferentes estirpes desse vírus, que se notabiliza por uma elevada capacidade de variação genética e antigênica (NDIFUNA et al., 1998, TAN et al., 2004).

Em adição ainda ao que foi exposto deve ficar esclarecido que poucos são os estudos a respeito da produção por aves infectadas e/ou vacinadas dos diferentes isótipos de anticorpos contra um dos antígenos estruturais mais relevantes do VBI, tal como se configura a proteína N desse mesmo vírus. Mais recentemente, Tan et al. (2004) demonstraram que todos os soros de pacientes infectados com coronavírus da SARS provenientes de fase aguda ou de convalescença, que foram testados em sua investigação, reagiram com a proteína N desse coronavírus, tendo sido verificado, também, que a detecção mais precoce da infecção era proporcionada pelos anticorpos dos isótipos IgA e IgM, enquanto que anticorpos contra a proteína N do isótipo IgG estavam mais aumentados nos soros de pacientes que se encontravam na fase de convalescença. No entanto, não há na literatura consultada, nenhuma referência sobre a mensuração de anticorpos de galinhas contra a nucleoproteína do VBI e associando-os a cada um dos três isótipos de imunoglobulinas aviárias (IgG, IgM e IgA) e que estejam presentes no soro sanguíneo e/ou na secreção lacrimal de galinhas.

Em vista de tudo o que foi explanado anteriormente e, sobretudo a importância do patógeno viral alvo de nosso interesse, das limitações ainda existentes nos meios de diagnóstico da infecção causada por este vírus e dos diferentes procedimentos que podem oferecer uma alternativa na montagem de um novo método de imuno-diagnóstico, julgou-se, então, oportuno e justificável, fazer a padronização e a aplicação um método de ELISA, usando-se a proteína N recombinante expressa em leveduras (Y-N-ELISA) como alvo antigênico para a detecção/mensuração de anticorpos específicos

dos 3 isótipos (IgG, IgA e IgM), presentes no soro ou na secreção lacrimal de galinhas que foram vacinadas ou experimentalmente infectadas pelo VBI.

Com relação à aplicação do método indireto de ELISA com a proteína N recombinante, a proteína foi produzida em leveduras da espécie *S. cerevisiae*, segundo Gibertoni, et al. (2005), e a técnica foi padronizada seguindo-se em linhas gerais a recomendação desses mesmos autores, exceto que, para a mensuração dos isótipos IgG, IgM e IgA de anticorpos contra o VBI, em amostras de soro e de secreção lacrimal de galinhas foram usados, em reações separadas, três conjugados imunoenzimáticos diferentes e específicos para cada um desses isótipos presentes no soro sanguíneo ou na secreção lacrimal de aves submetidas à infecção com as estirpe M41 do VBI, ou ainda, em aves em diferentes faixas etárias, que foram submetidas à vacinação e/ou revacinação.

Em um primeiro experimento foram colhidas, em uma granja comercial de postura, localizada na cidade de Bastos – SP, amostras de sangue e de secreção lacrimal das aves de postura divididas em 8 grupos, constituídos por 15 aves cada um e em diferentes idades e que haviam ou não recebido vacinações contra a BI (1 semana, 2 semanas, 10 semanas, 18 semanas, 24 semanas, 32 semanas, 45 semanas, 71 semanas e 89 semanas de idade). O número de vacinações que cada um dos grupos amostrados de aves recebeu variou de acordo com a idade das mesmas. Assim, essas aves receberam as 4 primeiras imunizações com vacina atenuada contendo a estirpe H120 do VBI, respectivamente, nas idades de 1 dia de vida e, depois, com 1 semana e com 3 semanas, sendo que com 8 semanas de idade foi administrada a vacina inativada oleosa formulada com a estirpe M41 do VBI. A partir desta faixa etária, as aves receberam novas imunizações com vacinas atenuadas, por meio de aerossol, a cada 8 semanas, repetidamente, até o descarte das mesmas. Para a obtenção de amostras de soro sanguíneo e de secreção lacrimal de referência positivas, para a mensuração de anticorpos anti-VBI para cada um dos isótipos testados (IgG, IgA e IgM), foram hiperimunizadas 5 galinhas SPF com a estirpe H120 do VBI, sendo feito, ao final do processo de hiperimunização e após a última colheita ou de sangue ou de secreção lacrimal, um pool dessas amostras, o qual passou a ser usado como amostra de referência positiva de soro ou de secreção lacrimal. Já um pool de amostras de soro e de secreção lacrimal colhidos de galinhas SPF foram empregados como amostras de referência negativas.

Foram também utilizadas neste trabalho, 45 aves comerciais de corte, fornecidas com 1 dia de idade, por um incubatório de produção avícola industrial, as quais quando foram alojadas em isoladores com pressão positiva e com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta. Aos 28 dias de idade, 3 aves foram sacrificadas constituindo o grupo de controle negativo (dia 0), sendo que as demais aves foram inoculadas com uma suspensão virulenta da estirpe M41 do VBI, contendo 10^7 DIE50%/mL, através da inoculação de duas gotas via ocular e duas gotas via nasal. Decorridos intervalos de 5, 10, 15, e 20 dias após a inoculação, grupos de três aves foram sacrificadas em cada um desses intervalos, para que fossem colhidas amostras de sangue, através de punção cardíaca e de secreção lacrimal, adicionando-se, por via ocular, duas gotas de glicerina e colhendo-se, logo em seguida a secreção produzida.

A priori, foi constatado que a infecção ou a vacinação de galinhas ou frangos de corte com o VBI estimulou a produção dos vários isótipos de anticorpos anti-VBI, tanto no soro sanguíneo como na secreção lacrimal, que no caso de IgM da secreção lacrimal, sofreram um aumento moderado e significativo já a partir do 5º dia pós-inoculação, sendo que os níveis de anticorpos, tanto deste isótipo, como dos demais, elevaram-se mais intensamente entre 10 dias a 2 semanas após a infecção ou a vacinação seguida ou não da revacinação.

O método indireto de ELISA usando-se a proteína N recombinante produzida em leveduras (Y-N-ELISA) foi usado com sucesso para a mensuração de anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA, presentes no soro sanguíneo e na secreção lacrimal de galinhas de postura vacinadas e revacinadas com a estirpe H120 do VBI. Os resultados demonstraram, para o soro sanguíneo que os níveis de anticorpos aumentaram de forma acentuada, após a aplicação de, no mínimo, duas vacinações, sendo que os anticorpos anti-VBI, principalmente do isótipo IgG permaneceram, depois da 10ª semana, elevados, durante praticamente todo o período avaliado, declinando para as aves mais velhas com 89 semanas de idade (Figura 1A). Os teores dos anticorpos detectados no soro sanguíneo e pertencentes aos isótipos IgM e IgA também apresentaram aumentos; inclusive a IgM mostrou um aumento mais precoce, porém, no geral, eles foram de menor magnitude do que a IgG e, ainda, suas concentrações alcançaram uma espécie de platô, revelando mais oscilações do que este último isótipo e decaindo a níveis mais baixos nas aves mais velhas que foram analisadas (Figura 1A).

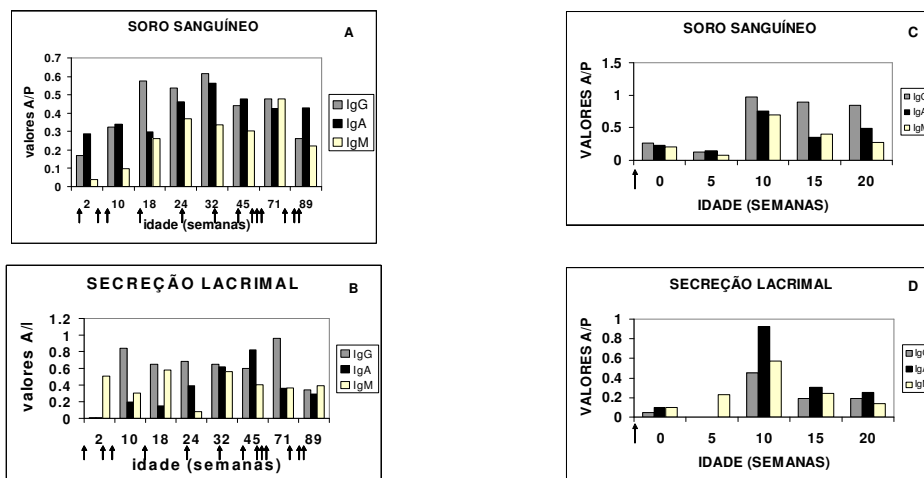


Figura 1. Perfis gráficos referentes aos níveis de anticorpos anti-VBI dos isótipos IgG, IgA, IgM, expressos em valores A/P médios que foram determinados na técnica de Y-N-ELISA, para anticorpos presentes no soro sanguíneo (A) e na secreção lacrimal (B) de galinhas de postura vacinadas e revacinadas em diferentes faixas etárias (as setas indicam as idades, nas quais as aves foram vacinadas, no caso 1,3,8,16,24,32,40,48,56,64,72,80 e 88 semanas). Perfis gráficos referentes aos títulos de anticorpos (imunoglobulinas totais e isótipos IgG, IgA, IgM), expressos em valores A/P médios, contra o VBI, no soro sanguíneo (C) e na secreção lacrimal (D) de frangos de corte submetidos à infecção experimental com a estirpe M41 do VBI, sendo as amostras coletadas nos dias 0,5,10,15 e 20 pós-infecção e os anticorpos anti-VBI de cada um dos isótipos foram detectados através do método Y-N-ELISA. A seta indica o dia da infecção experimental com a estirpe M41 do VBI.

Em relação à análise da produção dos isótipos IgG, IgA e IgM de anticorpos contra a proteína N do VBI nas amostras de secreção lacrimal de aves vacinadas e revacinadas (Figura 1B), verifica-se que os níveis de tais anticorpos comportaram-se de maneira diferente da que foi observada nas amostras de soro sanguíneo. Explanando melhor, os anticorpos pertencentes ao isótipo IgG mostraram um aumento significativo em seus níveis, fenômeno este que foi observado no grupo de aves mais jovens, isto é, com idade de 2 semanas, até a faixa etária seguinte estudada; isto é, aves com 10 semanas de idade e, a partir daí, tais anticorpos alcançaram uma espécie de platô, em torno do qual foram registradas ligeiras oscilações, até as aves atingirem 71 semanas de idade, ocasião em que foi houve um decréscimo mais acentuado nos níveis desses mesmos anticorpos. Já os níveis de anticorpos da classe IgM se mantiveram, de maneira geral, mais baixos do que o de IgG, porém mesmo assim apresentaram-se relativamente elevados. Por último, os níveis de anticorpos do isótipo IgA se mostraram mais reduzidos nas aves mais jovens que foram estudadas, porém, a partir da idade de 32 semanas as suas concentrações sofreram um significativo acréscimo e continuaram se elevando até a faixa etária seguinte de 45 semanas de idade e a partir daí, sofreram uma queda marcante, que foi registrada nos grupos de aves com 71 e 89 semanas de idade.

Os níveis médios de anticorpos anti-VBI de cada um dos três isótipos de anticorpos determinados no soro ou na secreção lacrimal de frangos de corte experimentalmente infectados com a estirpe M41 do VBI, revelaram uma típica soroconversão, com os perfis cinéticos sofrendo, a partir do desafio, aumentos gradativos, que ,ou foram detectados mais precocemente; aos 5 dias pós-desafio (p.d.), no caso de IgM na secreção lacrimal, ou a partir do 10º dia p.d., quando atingiram, para os três isótipos estudados, as maiores magnitudes médias (Figura 1). Os níveis desses anticorpos, ou persistiram elevados, o que ocorreu para os anticorpos do isótipo IgG presentes no soro sanguíneo, ou revelaram, para o soro sanguíneo, um declínio bastante evidente, que foi encontrado para os outros dois isótipos de anticorpos (IgM e IgA), enquanto que, na secreção lacrimal, todos os três isótipos de

anticorpos sofreram quedas acentuadas em seus teores, nos dois últimos intervalos p.d. investigados (Figura 1C e 1D).

Os resultados do teste Y-N-ELISA aplicados nesse estudo, demonstraram claramente que os anticorpos gerados nas aves submetidas à infecção experimental, ou ainda, à imunização e/ou revacinação com o VBI, apresentam um elevado nível de reatividade cruzada com a proteína N recombinante expressa em leveduras. Observações muito semelhantes às nossas, foram relatadas com a proteína N recombinante do VBI expressa em *E. coli* (NDFUNA et al., 1998), ou com essa mesma proteína estrutural expressa em células de inseto por meio de baculovírus (CHEN et al., 2003).

A proteína N recombinante preparada, como em nosso estudo, por meio do processo de clonagem e expressão em *S. cerevisiae*, revelou, dessa forma, sua capacidade de se combinar de forma bastante específica com anticorpos de galinhas infectadas ou vacinadas com o VBI, sugerindo que sua integridade antigênica manteve-se intacta e que ela conservou os principais epítomos que estão diretamente envolvidos na interação com tais anticorpos.

Referências Bibliográficas

- 1)Chen, H.; Coote, B.; Hiscox, J.A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. Avian Pathol. Houghton, v. 32, p. 519-526, 2003.
- 2)Di Fábio, J.; Rossini, L.I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: Berchieri, Jr, A. & Macari, M. Doença das aves. Campinas: FACTA, p. 293-300, 2000.
- 3)Gibertoni, A. M., et al. Development and application of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus. J.Clin. Microbiol. v. 43, p. 1982-1984, 2005.
- 4)Ndifuna, A. et al. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. J.Virol.Methods, Amsterdam, v. 70, p. 37-44, 1998.
- 5)Marquardt, W.W.; Snyder, D. B.; Schlotthober, B. A. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis., Kennet Square, v. 25, p. 713 – 722, 1981.
- 6)Snyder, D.B. et al. Rapid serological profiling by enzyme – linked immunosorbent assay III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. Avian Dis., Kennet Square, v. 25, p. 213-222, 1983.
- 7)Tan, Y.J. et al. Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome Coronavirus recombinant protein and their potential use as diagnostic markers. Clin. Diag. Labor.Immunol. v. 11, n. 02, p. 362-371, 2004.

Bolsa: CNPq