

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IMUNOGLOBULINA DE TILÁPIA E POSSÍVEL IDENTIFICAÇÃO EM MÉTODOS SOROLÓGICOS

Erna Elisabeth BACH¹; Leonardo TACHIBANA²; Danielle de Carla DIAS²; Carlos Massatoshi ISHIKAWA²; José DIAS-NETO³; Miguel Frederico Fernandez ALARCON³

¹Diretoria da Saúde, Biomedicina, UNINOVE, São Paulo, SP ernabach@gmail.com

²Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP tachibana@pesca.sp.gov.br

³PREVET – Laboratório de Diagnósticos e Sanidade Aquícola

Palavras chave: Ig-M; peixe; *Oreochromis niloticus*; ELISA

INTRODUÇÃO

Com o atual crescimento da utilização de regimes intensivos na criação de peixes, a ocorrência de situações estressantes é inevitável, pois os animais são submetidos a altas densidades de estocagem, manejo constante e baixa qualidade da água durante a criação (MELO *et al.*, 2009), podendo ocasionar maior susceptibilidade às doenças (WEDEMEYER, 1969; ALKAHEM, 1994). O emprego de vacinas na aquicultura como método imunoprolático tem aumentado significativamente em todo o mundo, seguindo o desenvolvimento desta atividade (GUDDING *et al.*, 1999). Apesar das vacinas contra os principais patógenos para peixes terem sido desenvolvidas, não é recomendado utilizá-las como único meio de prevenção, uma vez que promovem imunidade contra um número limitado de doenças (GUDDING *et al.*, 1999; SAKAI, 1999; GRAM *et al.*, 2001). Para avaliar a eficiência da vacina é importante desenvolver anticorpos anti-imunoglobulina de tilápia para identificação pelos métodos sorológicos.

O objetivo do presente trabalho foi identificar no soro da tilápia-do-nilo sadia e imunizada contra *Streptococcus agalactiae*, imunoglobulinas (IgM e IgG) e produzir em coelho o anti-IgM de tilápia-do-nilo, para desenvolvimento de testes sorológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco tilápias-do-nilo sadias com peso médio de 50,80 g foram anestesiadas em solução contendo eugenol (0,02 mg L⁻¹) e o sangue foi coletado via punção vaso caudal com uma seringa e agulha (G20), e após a separação do soro (*over night* a 4°C), cerca de 20 microlitros de cada amostra de soro foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida com Tampão tris glicina, pH 8,3; 0,1mol L⁻¹; 5 mA inicial e entrada de 25 mA, durante 2 horas. O gel foi corado com azul de Coomassie G250 para identificação das bandas. O soro foi submetido a passagem pela coluna de cromatografia Sephadex

G-200. A fração de imunoglobulinas foi precipitada *over night* com sulfato de amônio 40% e dialisada em sacos de diálise MM 10.000 daltons. A solução final contendo imunoglobulinas (IgM e IgG) foi homogeneizada com 50% de adjuvante incompleto de Freund e 1 mL foi usada na imunização de coelhos via linfonodo. Após protocolo de imunização e sangrias, o soro foi utilizado em teste de Ouchterlony (1953) e imunoeletroforese contra o pool do soro de cinco tilápias (aproximadamente 50 g) sadias e cinco outras vacinadas com 100 µL de bacterina (inativação com formalina 1% por 24 horas em temperatura 4°C e lavado três vezes com PBS) de *Streptococcus agalatae*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se, no gel de poliacrilamida, as bandas correspondentes à gama globulina, beta globulina, alfa1 e 2, albumina e outras duas bandas anteriores sem identificação. Após separação em cromatografia de gel de filtração, obteve-se apenas a fração imunoglobulina a qual foi usada para imunização em coelhos, conseguindo-se, em 20 dias, o antissoro da imunoglobulina da tilápia. Este antissoro foi usado nos testes sorológicos.

Com o teste de Ouchterlony, detectou-se a reação de precipitação do soro da tilápia sadia e vacinada, enquanto que, na imunoeletroforese, observou-se a reação com a presença de IgG na tilápia sadia e, IgG e IgM na tilápia vacinada. Desta forma, é possível separar do soro as imunoglobulinas IgG e IgM de tilápia-do-nilo vacinadas e, somente IgG de tilápias sadias. Foi possível produzir em coelhos o anti-IgM de tilápia.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados, conclui-se que foi possível detectar a diferença entre tilápia sadia e vacinada com a aplicação de anticorpo do coelho, e o soro poderá ser usado para marcação com enzimas e utilização futura no teste de ELISA.

REFERÊNCIAS

- ALKAHEM, H.F. 1994 The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of University Kuwait Science*, 21:243-252.
- GRAM, L.; LOVOLD, T.; NIELSIN, J.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B. 2001 *In vitro* antagonism of the probionte *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, 199: 1-11.

- GUDDING, R.; LILLEHAUNG, A.; EVENSEN, O. 1999 Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1/2): 203-212.
- MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; MELO, M.M.; JÚNIOR, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; GUIMARÃES, S.R. 2009 Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(5): 1183-1190.
- OUCHTERLONY, Ö. 1953 ANTIGEN-ANTIBODY REACTIONS IN GELS. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 32(2): 231-240.
- SAKAI, M. 1999 Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- WEDEMEYER, G. 1969 Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29(3): 1247-1251.