

**ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA MONENSINA: PRODUÇÃO E
SENSIBILIDADE POR IMUNOENSAIO**

RENATO DEL' ALAMO GUARDA^{1*}, KEILA MARIA RONCATO DUARTE², TATIANE CRISTINA
LAGASSI¹, CARLA CACHONI PIZZOLANTE³, JOSÉ EVANDRO DE MORAES³

1- Alunos de Mestrado. Laboratório de Produção de Anticorpos e Imunoensaios- Centro de Genética Reprodução Animal- Instituto de Zootecnia – APTA/SAA, Nova Odessa, São Paulo, Brasil.

2- Pesquisadora Científica- UPD Tietê - Polo Regional Centro Sul- APTA. Piracicaba, SP, Brasil

3- Pesquisadores Científicos. Laboratório de Produção de Anticorpos e Imunoensaios- Centro de Zootecnia Diversificada- Instituto de Zootecnia – APTA/SAA, Nova Odessa, São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência: renatodag@gmail.com

Resumo

O uso de leveduras vindas da fermentação alcoólica da cana-de-açúcar como suplemento em rações e outros alimentos constitui-se numa rica fonte de nutrientes. Durante o processo fermentativo, contudo, são adicionados na dorna substâncias para controlar as contaminações microbiológicas, como por exemplo, a monensina. A monensina constitui-se de um ionóforo que tem seu uso proibido no Mercado Europeu. Desta forma, anticorpos policlonais foram produzidos para desenvolvimento de um método de detecção da monensina em leveduras e ração animal. A validação desta metodologia começa com a determinação da sensibilidade do método. Neste caso, em ensaios com fortificação de amostras de ovos, a sensibilidade foi estabelecida em 40 ng por kg de matriz biológica., utilizando ensaio imunoenzimático em suporte sólido (ELISA).

Introdução

Monensina é um ionóforo obtido da fermentação de espécie de *Streptomyces* e tem sido utilizada desde 1971 como agente anticoccidiano em frangos de corte (RIBEIRO, 2000). Embora haja trabalhos relatando seus efeitos tóxicos em cavalos e em outros animais de produção, quando utilizada em grandes quantidades, seu uso na avicultura tem sido incentivado, por ser um excelente coccidiostático. O uso crescente de Leveduras secas ou liofilizadas, co produtos da fermentação alcoólica em rações, como suplementos probióticos e fontes de proteína e vitaminas, principalmente do complexo B, tem sido cada vez mais frequente, uma vez que se trata de produto de alto valor biológico e custo relativamente baixo. Neste contexto, a monensina vem como contaminante junto com a levedura, uma vez que é amplamente utilizada no controle de bactérias nas dornas de fermentação de álcool e açúcar (figura 1) A identificação de monensina em rações de aves, mesmo que não adicionadas na ração, ou seja, vindas das leveduras adicionadas, causam um problema para a produção orgânica (onde o uso de ionóforos é proibido) e para exportação, onde alguns mercados certificam os alimentos como livres de antibióticos. De acordo com Rigobello e Millen (2014) alguns países, principalmente os da União Europeia baniram desde 2006 o uso dos ionóforos como promotores de crescimento, por serem classificados como antibiótico, e por apresentar potencial de transferência de resistência antimicrobiana dos animais para os seres humanos. Nosso objetivo foi produzir anticorpos policlonais contra monensina e utilizar tais anticorpos para identificar resíduos de monensina em ração e matriz biológica.

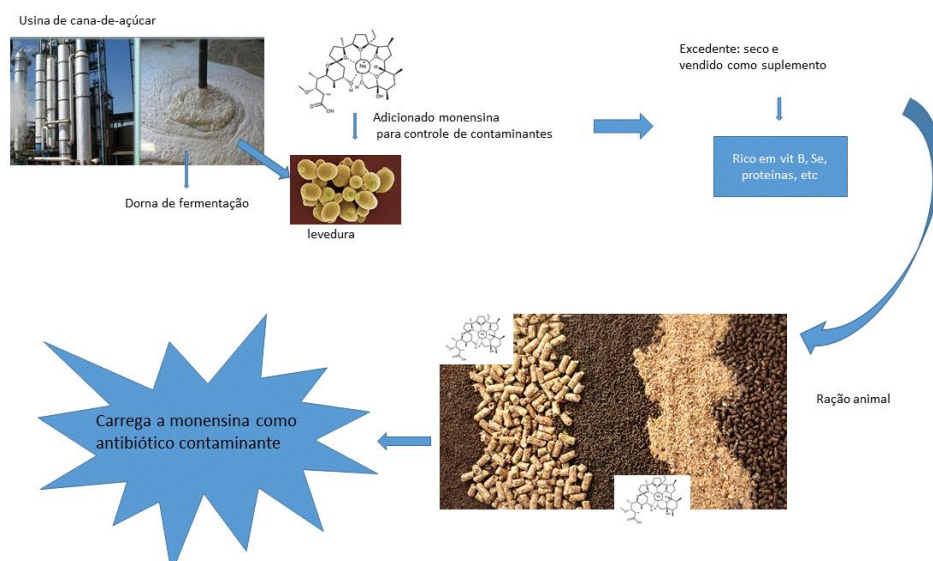


Figura 1 – Esquematização do uso de leveduras excedentes da fermentação alcoólica, como suplemento de alto valor, carregando resíduos da monensina para rações.

Material e Métodos

Anticorpos policlonais foram produzidos em Coelhas Nova Zelandia, após bioconjugação da monensina através do método das carbodiimidas (Hermanson, 1986) e as imunizações foram feitas a cada 15 dias, com Adjuvante Completo de Freund na primeira imunização, Adjuvante Incompleto de Freund na segunda imunização e as subsequentes com tampão fisiológico (pH 7,2), segundo metodologia descrita em Duarte et al. (2004). O soro foi separado e aliquotado para titulação por ELISA (ensaio imunoenzimático em suporte sólido), do tipo PTA (Plate trapped antigen), conforme descrito em Crowther (2009) com modificações (Guarda et al, 2017)

O ELISA foi realizado com peroxidase como sistema enzimático e SureBlue como revelador. Os dados foram lidos em Leitor de microplacas a 565 nm, após 30 minutos de revelação. A curva de calibração foi realizada com alíquotas de monensina e lidas a 420 nm, utilizando o sistema enzimático fosfatase alcalina, em leitor de microplacas (Biorad). A validação da sensibilidade foi realizada com amostras de clara e gema de ovos orgânicos, fortificados com monensina.

Resultados e Discussão

A identificação da monensina em ração animal e produtos da cadeia animal (carne, ovos e leite) deve ser feita de forma rápida e fácil, principalmente para produtos destinados a exportação e para certificação de produtos orgânicos. Os anticorpos produzidos foram selecionados da coelha 1 (Figura 2) e foram capazes de identificar monensina na concentração de 50 ng/mL.

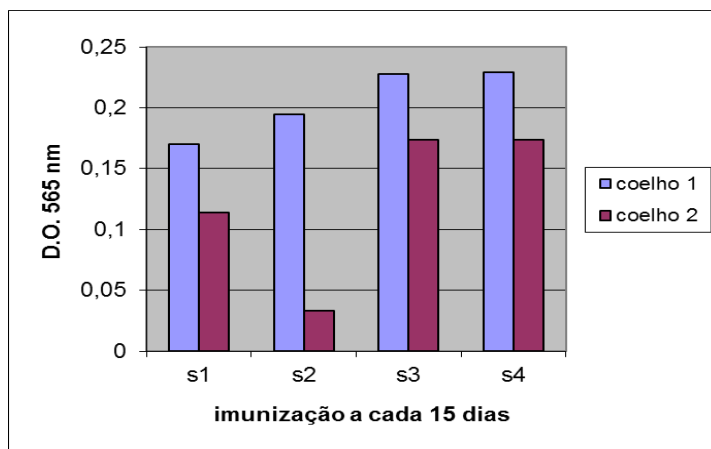


Figura 2 Titulação por ELISA – PTA, leitura a 565 nm . Soro coletado a cada 15 dias (S1, S2, S3 e S4) das coelhas produtoras de anticorpos contra monensina.

A determinação da sensibilidade do ELISA contra monensina foi realizada com fortificação de clara e gemas, provenientes de ovos orgânicos. Conforme a figura 3, as gemas não responderam à fortificação, provavelmente devido a quantidade de ácidos graxos presentes nesta matriz. Já com claras, a fortificação e sensibilidade do método foi determinada conforme tabela 1.

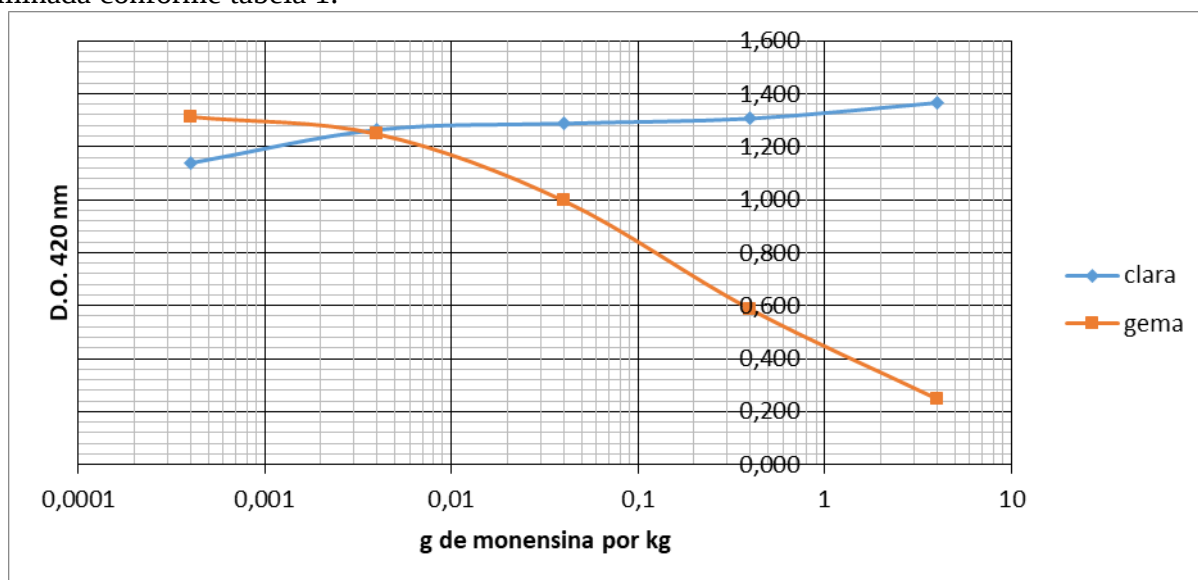


Figura 3 – Fortificação de amostras de clara e gema de ovos com monensina, tituladas em PTA-ELISA, a 420 nm.

Estes resultados mostram que a sensibilidade é de 40 ng por kg (valores de recuperação maiores que 93%. Segundo Paschoal et al (2004), tais parâmetros devem estar dentro de 7% a partir da curva do antígeno.

Tabela 1 – Resultado da fortificação de clara de ovos, comparadas à curva de monensina.

	monensina	clara fortificada	% recuperação
g/kg	D.O.	D.O.	
0,04000	1,364	1,307	95,82111437
0,00400	1,36	1,288	94,70588235
0,00040	1,345	1,264	93,97769517
0,00004	1,309	1,137	86,86019862

Conclusões

Os anticorpos produzidos em coelhas foram capazes de identificar a monensina vinda da fermentação alcoólica. Os ensaios de validação mostraram que a sensibilidade do método é de 40 ng por kg de amostra. Tal informação sobre a presença deste ionóforo nas rações e na levedura comercializadas como suplemento deveria estar discriminada, uma vez que sua presença não é proibida segunda normas brasileiras. A falta desta informação pode ocasionar problemas com certificação de produtos orgânicos (carne ou ovos) bem como certificação para exportação para o mercado europeu.

Referências Bibliográficas

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook** 2nd Ed. Series Springer Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 516. New Jersey: Human Press, 2009. 566 p.

DUARTE, K.M.R Protocolos e normas para uso de animais de laboratório para produção de anticorpos e soros. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 64, n. 2, 167-177, 2007.

GUARDA, R.D., LAGASSI, T.C., PIZZOLANTE, C.C., MORAES, J.E., SEMIDAMORE, B.T, DUARTE, K.M.R. Monensin: validation of polyclonal antibodies by immunoassay for food safety certification. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.74, suplemento, 2017.

GOMES, D. M., **Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal**. 2004. 69p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de Brasília, Brasília. 2004.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. 785 p.

PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; MEIRELLES, C.F. Determinacao de progesterona em plasma e leite de vacas: padronizacao de um imunoensaio ELISA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.2, p.84-92, 2004.

RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; PENS J.R., et al. Avaliação da Monensina no Desempenho e Rendimento de Carcaça e Partes de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.4, p.1141-1152, 2000.

RIGOBELLO, E; MILLEN, D. Utilização de probiótico e monensina sódica sobre o desempenho produtivo e características de carcaça de bovinos Nelore terminados em confinamento. **Revista brasileira de saúde e produção animal**, Salvador, v.15, n.2, p.415-424, 2014.