

ALINE DIAS PAIVA

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA DETECÇÃO DE
BOVICINA HC5 POR ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

RESUMO

PAIVA, Aline Dias, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2007.
Produção de anticorpos policlonais para detecção de bovicina HC5 por ensaios imunoenzimáticos. Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-orientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Maria Cristina Baracat Pereira.

Algumas bactérias produzem peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas, que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias da mesma espécie ou de espécies filogeneticamente relacionadas. Esses peptídeos têm sido estudados principalmente devido ao potencial para aplicação na indústria de alimentos, na medicina e na agropecuária. Bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por *Streptococcus bovis* HC5, apresenta similaridade com os lantibióticos e possui amplo espectro de ação. Apesar do grande potencial de aplicação das bacteriocinas, a produção destes peptídeos é frequentemente limitada pelos métodos de detecção, quantificação e purificação utilizados. Entretanto, os ensaios imunoenzimáticos podem ser utilizados como uma alternativa mais eficiente para a detecção e purificação de peptídeos antimicrobianos. Este trabalho teve como objetivo produzir anticorpos policlonais para detectar e quantificar a bacteriocina bovicina HC5 por meio de ensaios imunoenzimáticos e determinar o efeito citotóxico da bacteriocina sobre células Vero. A produção de anticorpos policlonais foi realizada com o peptídeo purificado em HPLC seguido da imunização de coelhos New Zealand e camundongos BALB/c e coleta periódica de sangue por até 60 dias. A análise imunoenzimática foi realizada por ELISA indireta e *Western blotting* em amostras coletadas de soro sanguíneo, extrato de células de *S. bovis* HC5 ou

sobrenadante das culturas cultivadas em meio basal. Bovicina HC5 foi capaz de gerar resposta imunológica, de intensidade moderada. Nenhuma reação inespecífica dos anticorpos foi observada com o sobrenadante de outras culturas lácticas nos ensaios de *Western blotting* e ELISA indireta, sendo detectada somente a bovicina HC5 purificada. No ensaio de difusão em meio sólido, o antissoro anti-bovicina HC5 neutralizou a atividade da bacteriocina em 75 %. Bioensaios indicaram que a bovicina HC5 começou a ser produzida durante o crescimento exponencial de *S. bovis* HC5 e a atividade biológica da bacteriocina aumentou quando a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento. A bovicina HC5 foi detectada no extrato de células e no sobrenadante da cultura de *S. bovis* HC5 pela técnica de ELISA indireta, a qual apresentou correlação com a atividade determinada por meio de bioensaios. A bovicina HC5 apresentou efeito tóxico sobre células Vero em concentrações iguais ou superiores a 100 µg mL⁻¹. Esses resultados indicam que ensaios imunoenzimáticos podem ser utilizados para a detecção de bovicina HC5, porém outros trabalhos deverão ser realizados para aumentar a sensibilidade da técnica. O efeito de bovicina HC5 sobre diferentes linhagens celulares deverá ser determinado para avaliar o potencial tóxico deste peptídeo e sua possível aplicação na produção animal.

ABSTRACT

PAIVA, Aline Dias, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June, 2007. **Production of polyclonal antibodies for the detection of bovicin HC5 by immunoenzymatic assays.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-Advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Maria Cristina Baracat Pereira.

Some bacteria produce antimicrobial peptides called bacteriocins that show bactericidal or bacteriostatic effect against other bacteria from the same species or species that are phylogenetically related. These peptides have been studied mainly due to their potential application in food industry, in medicine and in livestock production. Bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5, is similar to the lantibiotics and has a wide spectrum of action. Despite the great potential for practical applications, the production of bacteriocins is frequently limited by the methods used for detection, quantification and purification. However, immunoenzymatic assays can be used as an effective alternative to detect and purify antimicrobial peptides. This work aimed to produce polyclonal antibodies to detect and quantify the bacteriocin bovicin HC5 by immunoenzymatic assays and also to determine the cytotoxic effect of this bacteriocin on Vero cells. Production of the polyclonal antibodies was performed using HPLC-purified peptide followed by immunization of New Zealand rabbits and BALB/c mice. Periodical blood harvests were performed for up to 60 days. Immunoenzymatic analysis was carried out by indirect ELISA and Western blotting with samples from blood serum, *S. bovis* HC5 cell extracts or supernatants from cultures grown in basal media. Bovicin HC5 generated a immune response of moderated intensity. Nonspecific reactions were not

observed between the antibody and the supernatants of other lactic acid cultures by Western blotting and indirect ELISA analysis. Only the purified bovicin HC5 was detected using these techniques. Agar diffusion assays indicated that the anti-bovicin HC5 anti-serum could neutralize 75 % of the bacteriocin activity. The bioassay also indicated that production of bovicin HC5 by *S. bovis* HC5 started during exponential phase and the biological activity of the bacteriocin increased when the culture reached stationary phase. Bovicin HC5 could be detected in the cell extract and in the supernatant of the *S. bovis* HC5 culture using the indirect ELISA technique. There was a direct relationship between the activity determined by the ELISA technique and the bioassays. Bovicin HC5 showed toxic effect against Vero cells at concentrations equal to or greater than 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These results indicated that immunoenzymatic assays can be used to detect bovicin HC5, but further work is needed to improve the sensitivity of the technique. The effect of bovicin HC5 on different cell lineages must also be investigated to evaluate the toxicity of the peptide and its potential application in animal production.