

Juiz de Fora, MG / Agosto, 2025

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

Padronização de técnica de ELISA: dosagem de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 contra a proteína recombinante Spike (domínio RBD) do vírus SARS-CoV-2, causador da Covid-19, em soro e colostro bovino

Emanuelle Baldo Gaspar⁽¹⁾, Ana Paula Almeida Bastos⁽²⁾, Paola Eduarda de Almeida Souza⁽³⁾, Nicole Tafnes de Brito Silva Honório⁽³⁾, Luciano Paulino Silva⁽⁴⁾, Cinthia Caetano Bonatto⁽⁵⁾, Carlos Roberto Prudêncio⁽⁶⁾, Diego José Belato Ortis⁽⁷⁾, Hernan Hermes Monteiro da Costa⁽⁷⁾, Robert Domingues⁽⁸⁾, Leticia dos Santos Moreira⁽³⁾, Humberto de Mello Brandão⁽¹⁾, Jaciara Diavão⁽³⁾, Mariana Magalhães Campos⁽¹⁾, Wanessa Araújo Carvalho⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾ Pesquisadora, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, RS. ⁽³⁾ Bolsista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ⁽⁵⁾ Bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ⁽⁶⁾ Pesquisador Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. ⁽⁷⁾ Bolsista, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. ⁽⁸⁾ Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610
- Bairro Dom Bosco
36038-330 Juiz de Fora, MG
<https://www.embrapa.br/gado-de-leite>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Jorge Fernando Pereira
Secretário-executivo
Carlos Renato Tavares de Castro
Membros
*Cláudio Antônio Versiani Paiva,
Deise Ferreira Xavier, Edna
Froeder Arcuri, Fausto de Souza
Sobrinho, Fernando César
Ferraz Lopes, Francisco José
da Silva Ledo, Frank Ângelo
Tomita Bruneli, Heloísa Carneiro,
Jackson Silva e Oliveira, Juarez
Campolina Machado, Leovegildo
Lopes de Matos, Luiz Ricardo
da Costa, Márcia Cristina de
Azevedo Prata, Marta Fonseca
Martins, Pérsio Sandir D'Oliveira,
Rui da Silva Vermeque, Virginia
de Souza Columbiano e William
Fernandes Bernardo*

Edição executiva

Wanessa Araújo Carvalho
Revisão de texto
Carlos Renato Tavares de Castro
Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda Castro (CRB-
6/2749)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Luiz Ricardo da Costa

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

Resumo – A Covid-19 é uma doença viral que tem causado sérios problemas de saúde pública e elevado número de mortes globalmente. Anticorpos neutralizantes têm se mostrado uma estratégia eficaz no tratamento de casos graves da doença. Considerando que o colostro bovino é rico em anticorpos e possui alta homologia com a IgG humana, a Embrapa está desenvolvendo protocolos de imunização para utilizar vacas como biofábricas de anticorpos. Este estudo tem como objetivo padronizar uma técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para quantificação de anticorpos específicos anti-Spike (domínio RBD) do vírus SARS-CoV-2 nas subclasses IgG, IgG1 e IgG2. Para tal, vacas foram imunizadas no período pré-parto com o antígeno recombinante Spike (domínio RBD) do SARS-CoV-2 em uma formulação contendo adjuvante comercial à base de saponina (QuilA®). Amostras de soro e colostro foram coletadas no dia do parto para análise. Vacas não imunizadas foram utilizadas como controle. A técnica de ELISA foi padronizada para ambas as matrizes, variando-se a concentração do antígeno recombinante Spike (domínio RBD) para sensibilização das placas, além de diluições seriadas de soro e colostro e combinações com anticorpos de detecção. A padronização do teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indireto para quantificação de anticorpos específicos anti-Spike (domínio RBD) do vírus SARS-CoV-2 nas subclasses IgG, IgG1 e IgG2 em soro e colostro bovinos foi bem sucedida. RBD deve ser adsorvida overnight nas placas a 2 µg/mL, o soro ou o colostro devem ser diluídos a 1:200, exceto para pesquisa de IgG2 em soro, que deve ser diluído a 1:400. O anticorpo anti-IgG total deve ser diluído 1:20.000 e os anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2 devem ser diluídos 1:10.000. Os protocolos de ELISA estabelecidos serão fundamentais para o avanço no conhecimento sobre formulações vacinais e

protocolos de imunização que induzam o aumento de anticorpos específicos tanto no soro quanto no colostro de vacas. Isso permitirá o uso estratégico das vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes, constituindo uma alternativa ao tratamento de doenças infecciosas e abrindo um potencial nicho de mercado nutracêutico para o colostro bovino.

Termos para indexação: colostro, vaca, anticorpos, soro, COVID19, ELISA.

Standardization of ELISA technique for quantification of anti-spike IgG, IgG1, and IgG2 antibodies against SARS-CoV-2 in bovine serum and colostrum

Abstract – Covid-19 is a viral disease that has caused serious public health problems and a high number of deaths globally. Neutralizing antibodies have proven to be an effective strategy in treating severe cases of the disease. Considering that bovine colostrum is rich in antibodies and has high homology with human IgG, Embrapa is developing immunization protocols to use cows as antibody biofactories. This study aims to standardize an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) technique for quantifying specific anti-Spike antibodies (RBD domain) of the SARS-CoV-2 virus in the IgG, IgG1 and IgG2 subclasses. To this end, cows were immunized in the pre-partum period with the recombinant Spike antigen (RBD domain) of SARS-CoV-2 in a formulation containing a commercial saponin-based adjuvant (QuilA®). Serum and colostrum samples were collected on the day of delivery for analysis. Non-immunized cows were used as controls. The ELISA technique was standardized for both matrices, varying the concentration of the recombinant Spike antigen (RBD domain) to sensitize the plaques, in addition to serial dilutions of serum and colostrum and combinations with detection antibodies. The standardization of the indirect ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) test for quantifying specific anti-Spike (RBD domain) antibodies of the SARS-CoV-2 virus in the IgG, IgG1, and IgG2 subclasses in bovine serum and colostrum was successful. RBD should be adsorbed overnight onto the plates at 2 µg/mL, and serum or colostrum should be diluted to 1:200, except for IgG2 detection in serum, which should be diluted to 1:400. The

secondary antibody dilutions should be 1:20,000 for the anti-total IgG antibody and 1:10,000 for the anti-IgG1 and anti-IgG2 antibodies. The ELISA protocols established will be fundamental for advancing knowledge about vaccine formulations and immunization protocols that induce an increase in specific antibodies in both the serum and colostrum of cows. This will allow the strategic use of cows as biofactories for neutralizing antibodies, constituting an alternative to the treatment of infectious diseases and opening a potential nutraceutical market niche for bovine colostrum.

Index terms: colostrum, cow, antibodies, serum, COVID19, ELISA.

Introdução

A pandemia de Covid-19, causada pelo vírus Sars-CoV-2, tem imposto desafios sem precedentes à saúde pública global. Até janeiro de 2025 foram registrados mais de 700 milhões de casos e mais de 7 milhões de mortes ao redor do mundo (Worldometer, 2025). Além do elevado número de mortes, houve um efeito devastador com sobrecarga dos sistemas de saúde, além de prejuízos na infraestrutura educacional, social e econômica (Hiscott et al., 2020; Senevirathne et al., 2024). Em resposta a essa crise, diversas abordagens terapêuticas e preventivas têm sido exploradas, entre elas o uso de anticorpos neutralizantes, que têm se mostrado eficazes no tratamento de casos graves da doença (Zhang et al., 2024). Uma área promissora de pesquisa envolve o uso de vacas como biofábricas de anticorpos, aproveitando o potencial do colostro bovino, que é naturalmente rico em anticorpos que possuem alta homologia com a IgG humana.

O colostro é a primeira secreção produzida pelas vacas no final da gestação e liberado nas primeiras 24 a 36 horas após o parto (Borad; Singh, 2018). Este fluido é rico em diversos nutrientes, incluindo lactose, gordura, proteínas, lactoferrinas, citocinas, leucócitos, fatores de crescimento, vitaminas, minerais e, principalmente, imunoglobulinas da classe IgG (McGrath et al., 2016). A principal função do colostro bovino é fornecer imunidade aos bezerros, que, devido ao tipo de placentação sindesmocorial, não recebem transferência passiva de anticorpos durante a gestação (Linehan et al., 2023). Assim, o colostro torna-se a principal fonte de imunidade dos bezerros recém-nascidos, podendo fornecer até um quilograma de anticorpos por parto.

A produção de anticorpos em larga escala é crucial para atender à demanda terapêutica e

profilática durante pandemias. A utilização de vacas como biofábricas oferece várias vantagens, incluindo a capacidade de produzir grandes volumes de anticorpos em um curto período e a facilidade de escalonamento da produção. Vacas imunizadas podem gerar colostro contendo altos títulos de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 que podem ser utilizados tanto para terapias passivas quanto como suplementos nutracêuticos.

Para explorar essa estratégia, a Embrapa desenvolveu protocolos de imunização nos quais vacas são inoculadas no período pré-parto com o antígeno derivado do SARS-CoV-2: domínio de ligação de receptor (RBD, do inglês receptor binding domain) da proteína Spike recombinante. O antígeno foi emulsionado com um adjuvante comercial à base de saponina (QuilA®), amplamente

utilizado em bovinos e capaz de estimular resposta imune mediada por linfócitos e produção de anticorpos (Tomaiuolo et al., 2023). Visando verificar se a imunização foi eficaz na produção de soro e colostro hiperimune, foi feita uma padronização de técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para quantificação de anticorpos específicos anti-Spike (domínio RBD) do SARS-CoV-2, nas subclasses IgG, IgG1 e IgG2. O ELISA indireto é uma técnica de imunoensaio usada para detectar anticorpos específicos em uma amostra, utilizando um antígeno fixado na placa. Após a adição da amostra, um anticorpo secundário conjugado com uma enzima é aplicado, que ao reagir com o substrato, produz uma mudança de cor indicativa da presença do anticorpo alvo (Figura 1).

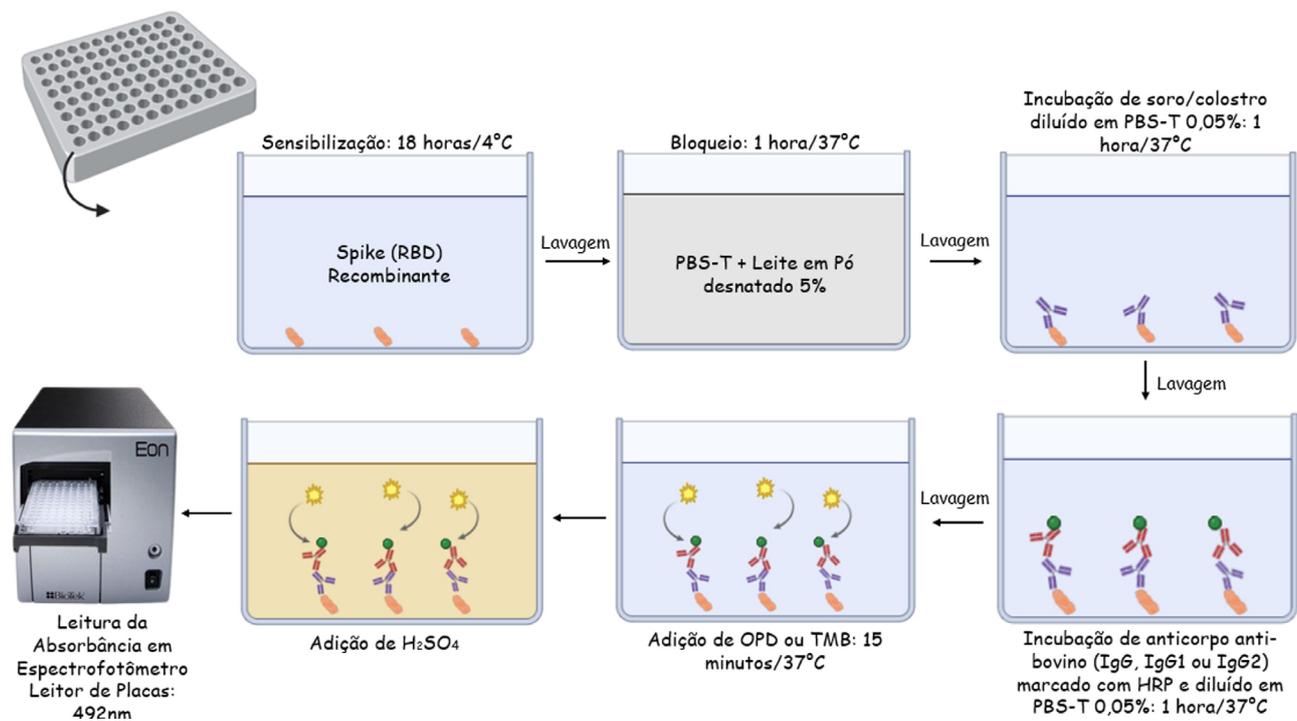


Figura 1. Representação esquemática da técnica ELISA indireta para pesquisa de anticorpos contra Spike (RBD) em colostro e soro de bovinos.

Esses protocolos permitirão avanços significativos no desenvolvimento de formulações vacinais e protocolos de imunização que induzam a produção anticorpos específicos, tanto no soro quanto no colostro de vacas. Isso abre novas perspectivas para o uso de vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes, oferecendo uma alternativa viável e escalável para o tratamento de doenças infecciosas, incluindo a Covid-19.

As informações contidas nesse documento contribuem para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas (ONU), especificamente para o ODS 3 - Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades.

Material e métodos

Imunização de animais

Vacas da raça Holandesa no terço final da gestação foram divididas em dois grupos ($n = 5$) contendo duas fêmeas primíparas e três múltiparas.

As formulações vacinais contendo 150 μg da proteína Spike recombinante (domínio RBD), produzida e purificada por colaboradores do Instituto Adolfo Lutz (Costa et al., 2023), foi diluída no adjuvante comercial

QuilA® (Sigma-Aldrich, USA). Estas formulações foram administradas por via intramuscular na região do pescoço, aos 45, 30 e 15 dias antes do parto. Cada animal recebeu 2 mL da formulação vacinal correspondente, totalizando 150 μg (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como controle foram utilizadas cinco vacas inoculadas com soro fisiológico. Amostras de soro sanguíneo foram obtidas antes de cada imunização e no dia do parto, momento em que também foram coletadas amostras de colostro, conforme Figura 2.

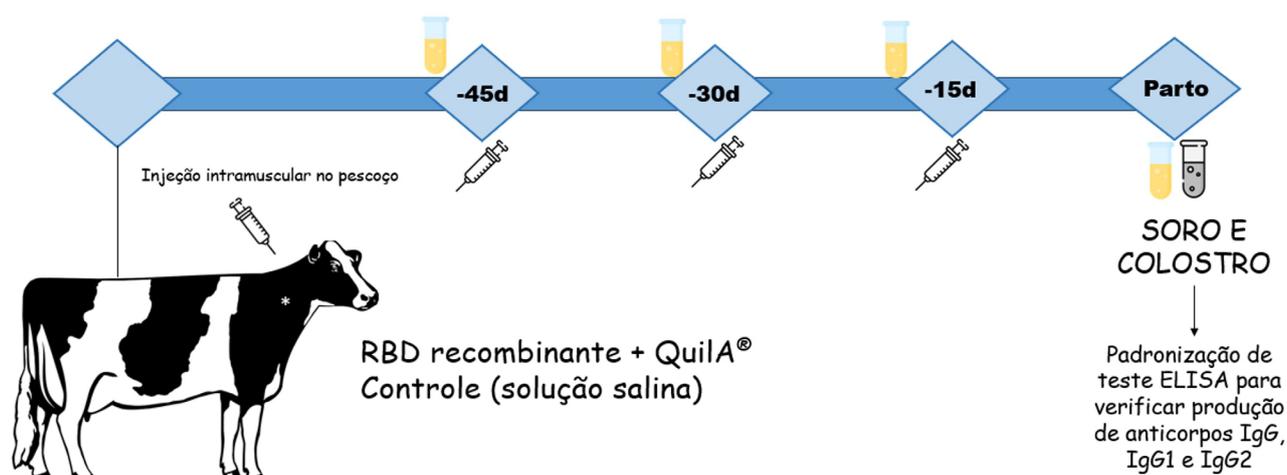


Figura 2. Representação esquemática do protocolo de imunização de vacas. Comitê de ética no uso de animais.

Aspectos legais

Este estudo foi conduzido seguindo os preceitos dos Três Rs, e sua execução foi aprovada pelo Comitê de ética no uso de animais, sob protocolo número 1915290721.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Esse ensaio foi padronizado para avaliar a produção de anticorpos em soro e colostro dos animais imunizados. Para tal, placas de ELISA de 96 poços (High Bind, Corning®, EUA) foram sensibilizadas com 100 μL de quantidades variadas da proteína recombinante Spike (domínio RBD) diluída em tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9.6 (Sigma-Aldrich, EUA) por um período de 18 horas (Figura 1). Foram testadas quatro concentrações do antígeno, diluídas de forma decrescente na base 2, começando em 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para soro e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para colostro, finalizando com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como

controle negativo de ligação do antígeno e teste de eficiência do bloqueio de sítios inespecíficos da placa (branco), foi utilizado somente o tampão Carbonato-Bicarbonato na ausência de antígenos. Posteriormente, foi realizado o descarte do antígeno não aderido e lavagem das placas com PBS (Sigma-Aldrich, EUA)-Tween® 20 (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,05% (3 X/ 200 μL por poço). O bloqueio de sítios inespecíficos livres foi procedido com 200 μL de PBS-Tween e leite em pó desnatado 5% (Accumedia, Prolab, Brasil) seguido de incubação a 37 °C por duas horas. Uma nova lavagem foi efetuada com PBS Tween a 0,05% (3X/ 200 μL por poço). Para testar as amostras de colostro e soro, foram feitos pools com 200 μL de cada amostra de cada animal. Para padronização foram utilizadas amostras positivas, provenientes de cinco animais imunizados com antígeno recombinante em adjuvante QuilA® por três vezes, coletadas 15 dias após a última imunização.

O pool de amostras negativas foi coletado na mesma data, de cinco animais inoculados somente com soro fisiológico. Para as amostras de colostro, os pools foram submetidos à centrifugação refrigerada (1000 xg/4 °C/20 minutos) para remoção do excesso de gordura, formadora de uma capa no topo do tubo, utilizando-se apenas a fase líquida para análise. Tanto as amostras de colostro quanto as de soro foram diluídas em PBS-Tween 0,05%, de forma decrescente na base 2, começando em 1:50 até 1:400, totalizando quatro diluições testadas. As amostras foram incubadas nas placas (100 µL/poço) a 37 °C por 1 h. Em seguida, o soro e o colostro diluídos foram descartados e as placas foram novamente lavadas com PBS Tween a 0,05% (3X/200 µl por poço) para retirada do excesso de amostra. Como anticorpos de detecção foram utilizados, separadamente, anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2 bovinos (Bethyl®), testados nas diluições de 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 em PBS Tween 0,05% com base nas recomendações do fabricante. A incubação foi feita a 37 °C por 1 h seguida de lavagem com PBS Tween a 0,05% (6X/200 uL por poço). Em seguida foi feita a revelação com Dicloridrato de O-Fenilenodiamina (OPD; OPD SIGMAFAST™, Sigma®, EUA) conforme recomendação do fabricante. Basicamente, a solução foi incubada na placa (85 µL por poço) por 15 min, à temperatura ambiente, e a revelação foi interrompida com H₂SO₄ na concentração de 3 M (50 µL por poço). Foram feitas duplicatas de cada amostra. A leitura da absorbância dos poços foi feita em um espectrofotômetro de placa (EONTM, BioTeck, EUA) a 492 nm. Os resultados de absorbância foram utilizados para a confecção de gráficos, no software Prism-GraphPad®, que permitiram a escolha da melhor concentração de antígeno e anticorpo a serem utilizados, conforme preconizado por Crowther (2001). Para cada subtipo de anticorpo (IgG total, IgG1 e IgG2 bovinos) foi feita uma padronização distinta. Além dos dados de absorbância plotados em gráficos, também foram calculadas as razões entre as absorbâncias obtidas

com o pool de soros positivos e negativos (Abs pool positivo/Abs pool negativo) para cada combinação de fatores, seguindo o que é preconizado em literatura (Crowther, 2001; Shah; Maghsoudlou, 2016). Estes cálculos foram feitos no programa Excel®

Resultados e discussão

Padronização de ELISA indireto para dosagem de anticorpos em soro e colostro

A padronização de técnicas de quantificação de anticorpos por ELISA é essencial para garantir a eficácia e segurança em protocolos vacinais. Uma padronização minuciosa possibilita a escolha das concentrações ótimas de antígeno e soro teste a serem usadas de forma a garantir robustez e reprodutibilidade nos ensaios. Visando estabelecer o modelo de vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes contra o vírus da Covid-19 em soro e colostro, foi testado um protocolo de imunização utilizando três doses da formulação, com intervalo de 15 dias entre estes, todos realizados no terço final da gestação. Essa estratégia de imunização foi adotada devido à alta eficácia, já descrita em literatura, para avaliar a produção de anticorpos frente a vacinação com patógenos atenuados e proteínas recombinantes, para obtenção de colostro hiperimune, ou seja, enriquecido em anticorpos específicos (Jenkins et al., 1999; Kramski et al., 2012; González et al., 2013; Kim et al., 2023;). Dessa forma, neste estudo, foi padronizada uma técnica de ELISA para quantificação de anticorpos específicos anti-Spike (domínio RBD) do SARS-CoV-2, nas subclasses IgG, IgG1 e IgG2, tanto em soro quanto em colostro bovino (Tabela 1). Variando-se, de forma combinatória, de acordo com a metodologia de chessboard (do inglês, tabuleiro de xadrez) (Crowther, 2001), as concentrações de antígeno utilizado para imobilização em placa, além das diluições de soro e colostro, foi possível determinar as condições ótimas de detecção para todas as subclasses de anticorpo (Figura 3).

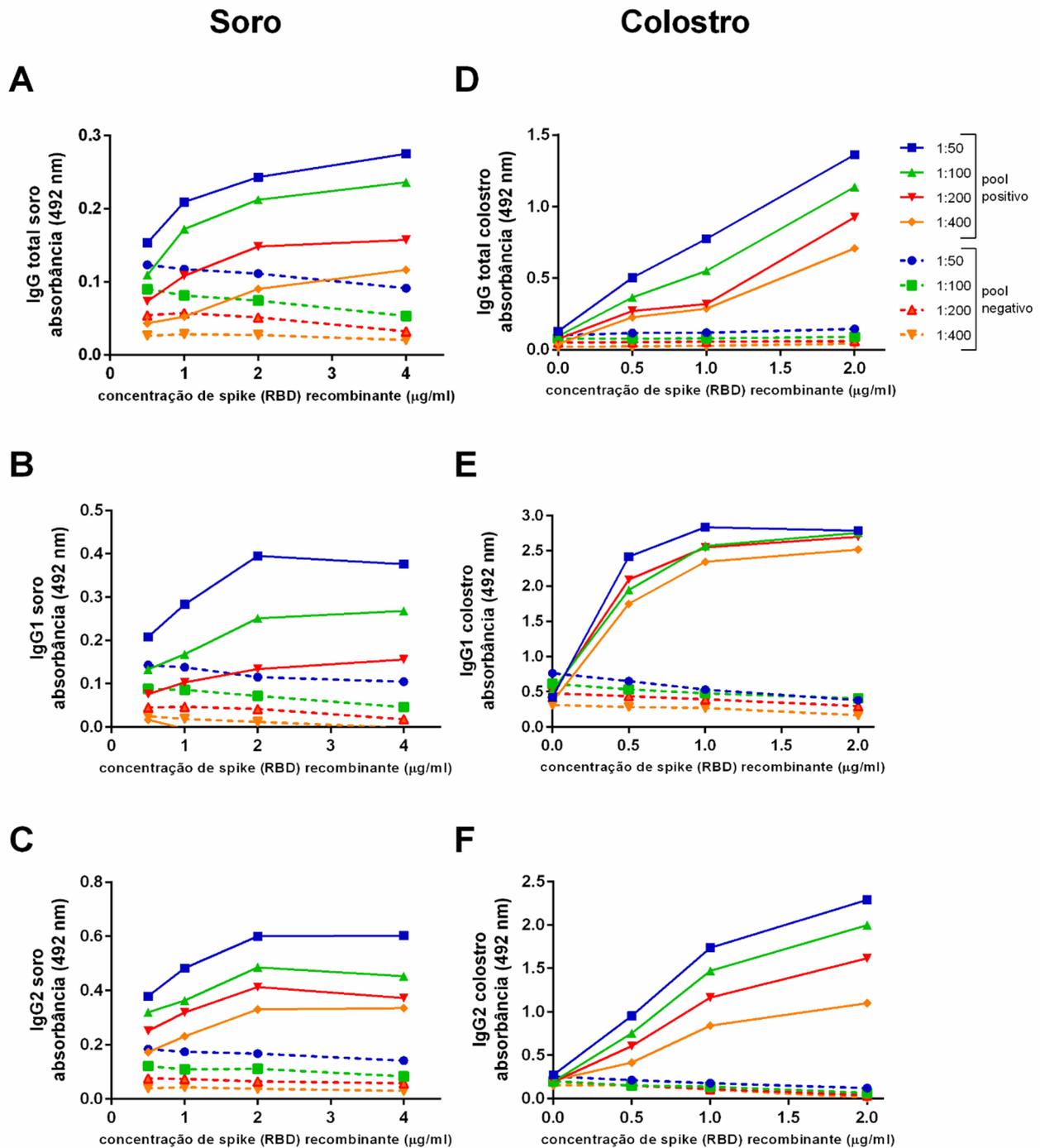


Figura 3. Curvas de detecção de anticorpos anti-spike (RBD) recombinante do vírus SARS-CoV-2-CoV-2 em soro e colostro de vacas imunizadas. Os pools de soro e de colostro usados para a padronização foram coletados no momento do parto e foram obtidos pela mistura de porções iguais de soro ou colostro de cinco animais imunizados com spike (RBD)+QuilA® (pools positivos) ou cinco animais inoculados com soro fisiológico (pools negativos). Em A, B e C as placas foram adsorvidas com spike (RBD) em diferentes concentrações e testadas com pool de soros positivos ou negativos, em quatro diluições, reveladas com anticorpos conjugados com peroxidase que reconhecem IgG total (A), IgG1 (B) ou IgG2 (C) bovinas. Já em D, E e F as placas foram adsorvidas com spike (RBD) em diferentes concentrações e testadas com pool de colostros positivos ou negativos, em quatro diluições, reveladas com anticorpos conjugados com peroxidase que reconhecem IgG total (D), IgG1 (E) ou IgG2 (F) bovinas.

Tabela 1. Número de clones selecionadas das melhores famílias e seus respectivos cruzamentos obtidos a partir de esquema dialélico ou cruzamentos direcionados para uso energético.

Condições gerais								
Subclasses	Concentração de antígeno (µg/mL)	Incubação	Bloqueio	Diluição do soro	Incubação (horas)	Diluição do corp de detecção	Incubação (horas)	Revelação
IgG	2	Overnight 4 °C	PBS-Tween® + leite desnatado 5%	1:200	2	1:20.000	1	Dicloridrato de O-fenilenediamina (OPD)
IgG1	2	Overnight 4 °C	PBS-Tween® + leite desnatado 5%	1:200	2	1:10.000	1	Dicloridrato de O-fenilenediamina (OPD)
IgG2	2	Overnight 4 °C	PBS-Tween® + leite desnatado 5%	1:400	2	1:10.000	1	5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB)
IgG	2	Overnight 4 °C	PBS-Tween® + leite desnatado 5%	1:200	2	1:20.000	1	Dicloridrato de O-fenilenediamina (OPD)
IgG1	2	Overnight 4 °C	PBS-Tween® + leite desnatado 5%	1:200	2	1:10.000	1	Dicloridrato de O-fenilenediamina (OPD)
IgG2	2	Overnight 4 °C	PBS-Tween® + leite desnatado 5%	1:200	2	1:10.000	1	Dicloridrato de O-fenilenediamina (OPD)

Colostro

Para as amostras de soro, o valor de absorvância praticamente se estabiliza após 2 µg/mL, ou seja, atinge um platô nesta concentração (Figura 3A, 3B e 3C). Desta forma, optamos por escolher esta concentração de antígeno para trabalhar. Ademais, como a obtenção de antígeno era um fator crítico, também optamos por testar os colostros com esta concentração como sendo a máxima testada (Figura 3D, 3E e 3F). Desta forma, só observamos um platô de absorvância nos testes de colostro, para a subclasse IgG1 (Figura 3E). Assim, optamos por trabalhar com a concentração de 2 µg/ml no colostro, mesmo para a subclasse IgG1, pela facilidade de processar diferentes testes no mesmo dia, já que, desta forma, a quantidade de antígeno adsorvida, que é a primeira etapa da realização do teste, era constante para todas as subclasses avaliadas. Para determinar as concentrações de soro escolhidas, focamos, principalmente em avaliar a razão entre as leituras de absorvâncias das amostras positivas, oriundas de animais imunizados com a proteína spike (RBD) recombinante em adjuvante QuilA®, e negativa, de animais inoculados com soro fisiológico. Desta forma, pudemos determinar concentrações ótimas de ensaio (Tabela 1). Sob essa perspectiva, é de extrema importância utilizar testes padronizados durante a pesquisa, a fim de evitar interpretações errôneas durante o desenvolvimento de projetos. Com relação ao conjugado, determinamos que o conjugado anti-IgG total pode ser diluído a 1:20.000, enquanto que os conjugados anti-IgG1 e IgG2 podem ser diluídos a 1:10.000.

Conclusões

A padronização do teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indireto para quantificação de anticorpos específicos anti-Spike (domínio RBD) do vírus SARS-CoV-2 nas subclasses IgG, IgG1 e IgG2 em soro e colostro bovinos foi bem sucedida. RBD deve ser adsorvida overnight nas placas a 2 µg/mL, o soro ou o colostro devem ser diluídos a 1:200, exceto para pesquisa de IgG2 em soro, que deve ser diluído a 1:400 e a diluição dos anticorpos secundários deve ser 1:20.000 para o anticorpo anti-IgG total e 1:10.000 para os anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2. Os testes de ELISA padronizados mostraram-se factíveis e de fácil execução, permitindo futuras avaliações de desenvolvimento e caracterização de resposta imune à RBD.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica de Minas Gerais (Fapemig; APQ-00659-21), Embrapa Gado de Leite e ao Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária (LMBS) pelo apoio na condução de experimentos. Ao Instituto Adolfo Lutz pela parceria de pesquisa, produção e purificação de antígenos. Às agências de fomento pela concessão de bolsas de iniciação científica e mestrado: Fapemig e Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- BORAD, S. G.; SINGH, A. K. Colostrum immunoglobulins: processing, preservation and application aspects. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 201-210, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.05.016>.
- COSTA, H. H. M.; ORTS, D. J. B.; MOURA, A. D.; DUARTE-NETO, A. N.; CIRQUEIRA, C. S.; RÉSSIO, R. A.; KANAMURA, C. T.; MIGUITA, K.; FERREIRA, J. E.; SANTOS, R. T. M.; ADRIANI, P. P.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ASTRAY, R. M.; CATARINO, R. M.; LANCELOTTI, M.; PRUDENCIO, C. R. RBD and spike DNA-based immunization in rabbits elicited IgG avidity maturation and high neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2. **Viruses**, v. 15, n. 2, 555, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15020555>.
- CROWTHER, J. R. **The ELISA** guidebook. Totowa: Humana Press, 2001. 421 p.
- GONZÁLEZ, D. D.; RIMONDI, A.; AGUIRREBURUALDE, M. S. P.; MOZGOVOJ, M.; BELLIDO, D.; WIGDOROVITZ, A.; DUS SANTOS, M. J. Quantitation of cytokine gene expression by real time PCR in bovine milk and colostrum cells from cows immunized with a bovine rotavirus VP6 experimental vaccine. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 703-708, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.016>.
- HISCOTT, J.; ALEXANDRIDIS, M.; MUSCOLINI, M.; TASSONE, E.; PALERMO, E.; SOULTSIOTI, M.; ZEVINI, A. The global impact of the coronavirus pandemic. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 53, 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.010>.
- JENKINS, M. C.; O'BRIEN, C.; TROUT, J.; GUIDRY, A.; FAYER, R. Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. **Vaccine**, v. 17, n. 19, p. 2453-2460, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00369-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00369-7).

KIM, U. H.; KANG, S. S.; JANG, S. S.; KIM, S. W.; CHUNG, K. Y.; KANG, D. H.; PARK, B. H.; HA, S. Bovine viral diarrhoea virus antibody level variation in newborn calves after vaccination of late-gestational cows. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 9, 562, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci10090562>.

KRAMSKI, M.; CENTER, R. J.; WHEATLEY, A. K.; JACOBSON, J. C.; ALEXANDER, M. R.; RAWLIN, G.; PURCELL, D. F. J. Hyperimmune bovine colostrum as a low-cost, large-scale source of antibodies with broad neutralizing activity for HIV-1 envelope with potential use in microbicides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4310-4319, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00453-12>.

LINEHAN, K.; ROSS, P. R.; STANTON, C. Bovine colostrum for veterinary and human health applications: a critical review. **Annual Reviews In Food Science and Technology**, v. 14, p. 387-410, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-014650>

MCGRATH, B. A.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; KELLY, A. L. Composition and properties of bovine colostrum: a review. **Dairy Science and Technology**. v. 96, p. 133-158, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>.

SENEVIRATHNE, T. H.; WEKKING, D.; SWAIN, J. W.; SOLINAS, C.; SILVA, P. de. COVID-19: from emerging variants to vaccination. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 76, p. 127-141, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.11.005>.

SHAH, K.; MAGHSOUDLOU, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **British journal of hospital medicine**, v. 77, n. 7, p. C98-C101, 2016. DOI: <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>.

TOMAIUOLO, S.; JANSEN, W.; MARTINS, S. S.; DEVRIENDT, B.; COX, E.; MORI, M. QuilA® adjuvanted Coxevac® sustains Th1-CD8+-type immunity and increases protection in *Coxiella burnetii*-challenged goats. **NPJ Vaccines**, v. 8, article 17, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00607-z>.

WORLDOMETER. **Covid-19 coronavirus pandemic: coronavirus cases: 704.753.890**. Disponível em: https://www.worldometers.info/coronavirus/#google_vignette. Acesso em: 27 jan. 2025.

ZHANG, T.; YANG, D.; TANG, L.; HU, Y. Current development of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 neutralizing antibodies: review. **Molecular Medicine Reports**, v. 30, n. 2, p. 148, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13272>.



*Ministério da Agricultura e
Pecuária*