

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina”

por

Fernanda Nunes Santos

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Sergio Augusto de Miranda Chaves

Segundo orientador: Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva

Rio de Janeiro, janeiro de 2012.

Esta tese, intitulada

“Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina”

apresentada por

Fernanda Nunes Santos

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Antonio Teva

Prof.^a Dr.^a Flavia Coelho Ribeiro

Prof.^a Dr.^a Eliame Mouta Confort

Prof. Dr. Antonio Nascimento Duarte

Prof. Dr. Sergio Augusto de Miranda Chaves – Orientador principal

Tese defendida e aprovada em 10 de janeiro de 2012.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

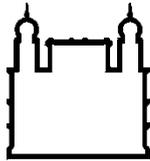
S237 Santos, Fernanda Nunes
Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da
leishmaniose visceral canina. / Fernanda Nunes Santos. -- 2012.
xix, 98 f. : il. ; tab. ; graf. ; mapas

Orientador: Chaves, Sergio Augusto de Miranda
Silva, Valmir Laurentino

Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio
Arouca, Rio de Janeiro, 2012.

1. Leishmaniose Visceral-diagnóstico. 2. Anticorpos. 3.
Imunoglobulinas. 4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 5.
Biotecnologia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 10 de janeiro de 2012.

Fernanda Nunes Santos

CG/Fa

Serviço de Gestão Acadêmica - Rua Leopoldo Bulhões, 1.480, Térreo – Manguinhos-RJ – 21041-210
Tel.: (0-XX-21) 2598-2730 ou 08000230085

E-mail: secasp@ensp.fiocruz.br Homepage: <http://www.ensp.fiocruz.br>

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para sua realização

“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Darwin

RESUMO

Os métodos de diagnóstico sorológico são ainda as ferramentas mais realistas e aplicáveis para identificação de cães com leishmaniose visceral. A pesquisa por métodos sorológicos mais eficientes e de produção simplificada é importante para a identificação do reservatório canino, ação primordial para o controle da doença. Este estudo teve por objetivo o desenvolvimento e a avaliação do desempenho de um ELISA para leishmaniose visceral canina, utilizando como conjugado enzimático uma IgY anti-IgG canina. Para isto, galinhas poedeiras foram imunizadas com IgG canina purificada e a IgY anti-IgG foi isolada das gemas dos ovos por precipitação com polietilenoglicol e purificada por meio de adsorção tiofílica. A especificidade frente ao antígeno imunizante foi verificada por imunodifusão radial dupla, ELISA e western-blot. O ELISA foi desenvolvido utilizando IgY conjugada a enzima peroxidase, tendo seus parâmetros de acurácia avaliados e comparados com o ELISA utilizando IgG de mamíferos conjugada a peroxidase. A concentração total de IgY isolada nas gemas foi constante, sem diferença significativa nos meses analisados ($p>0,05$), com média de 97,55 mg de IgY/ gema. A IgY produzida reconheceu a IgG canina, demonstrando uma forte sensibilidade e especificidade no ELISA, porém na imunodifusão não foi detectada ligação da IgY produzida a IgG canina. Após a imunização, houve um aumento significativo da produção de IgY específica do primeiro para o segundo mês ($p<0,05$) onde ocorreu um pico estável sem queda de produção até o final do período analisado ($p>0,05$). A IgY demonstrou ainda, forte reatividade no western-Blot frente a IgG canina purificada e a presente no soro de cão clinicamente saudável, não sendo capaz de reconhecer IgG de outras espécies animais. A conjugação da IgY a enzima peroxidase ocorreu sem danos à sua estrutura, com discriminação entre as amostras positivas e negativas em todas as diluições do conjugado e concentrações do antígeno testadas. O ELISA utilizando IgY conjugada a peroxidase apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A comparação dos parâmetros de acurácia do ELISA utilizando IgY com o ELISA utilizando IgG de mamíferos demonstraram valores idênticos. A repetibilidade do ensaio de ELISA IgY foi superior a encontrada com o ELISA IgG, com coeficiente de correlação intraclasse (ICC) estatisticamente significativo ($p<0,0001$). Um maior agrupamento das amostras negativas e positivas, também verificada quando a correlação das duplicatas nas duas observações foram analisadas ($p<0,0001$). Diante de todos esses resultados a IgY ligada à peroxidase demonstrou ser um conjugado enzimático de excelente qualidade, revelando um melhor desempenho quando comparado ao conjugado produzido por mamíferos.

Palavras chaves: Produção de IgY, Leishmaniose Visceral canina, ELISA.

ABSTRACT

The serological diagnostic methods are still the most realistic and applicable tools for the identification of dogs with visceral leishmaniasis. The research for more efficient methods of simple execution for the identification of the canine reservoir is extremely important for disease control. The aim of this study was the development and performance evaluation of an ELISA assay for canine visceral leishmaniasis, using as enzyme conjugate an IgY anti-dog IgG. To this end, laying hens were immunized with purified dog IgG, and the IgY anti-IgG was isolated from the egg yolks by precipitation with polyethylene glycol and purified through thiophilic adsorption. The specificity against the immunizing antigen was assessed by double radial immunodiffusion, ELISA and western-blot. The ELISA was developed using IgY conjugated to horseradish peroxidase enzyme, and the accuracy parameters were assessed and compared with ELISA using mammalian IgG conjugated to horseradish peroxidase. The total concentration of IgY isolated from the yolks was constant, no significant difference was detected over the months of duration of the study ($p>0.05$) and the mean was 97.55 mg IgY/ yolk. The IgY produced recognized dog IgG, showing a strong sensitivity and specificity in ELISA, but it was not detected in the double radial immunodiffusion. After immunization, the production of specific IgY increased significantly from the first to the second month ($p<0.05$) and then a stable peak with no production decrease was observed until the end of the analyzed period ($p>0.05$). In the western-blot, IgY showed high reactivity against purified dog IgG and that present in the serum of clinically healthy dogs, and it was not able to recognize the IgG from other animal species. IgY was conjugated to horseradish peroxidase enzyme without any damage to its structure, distinguishing between positive and negative samples in all conjugate dilutions and antigen concentrations tested. The ELISA using IgY conjugated to horseradish peroxidase showed 100% sensitivity and 100 % specificity. The comparison of the accuracy parameters of ELISA using IgY and ELISA using mammalian IgG showed identical values. The repeatability of ELISA IgY was higher than that found with the ELISA IgG, with interclass correlation coefficient (ICC) was statistically significant ($p<0,0001$), a larger grouping of positive and negative samples that was also verified when the correlation of duplicates of both observations was analyzed ($p<0.0001$). Thus, IgY linked to horseradish peroxidase proved to be an excellent conjugate that showed better performance than the conjugate produced by mammals.

Kew words: IgY Production, Canine Visceral Leishmaniasis, ELISA.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras e tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
1- Introdução	1
1.1- Leishmaniose Visceral.....	1
1.1.1- Transmissão e ciclo biológico.....	1
1.1.2- Leishmaniose Visceral Canina.....	2
1.1.3- Epidemiologia das Leishmanioses.....	3
1.1.4- Controle da Leishmaniose Visceral.....	5
1.1.5- Clínica na Leishmaniose Visceral Canina.....	6
1.1.6- Resposta imune humoral na Leishmaniose Visceral Canina.....	7
1.1.7- Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	8
1.2- A imunoglobulina Y.....	11
1.2.1- Histórico da Imunoglobulina Y.....	11
1.2.2- Estrutura molecular da IgY.....	11
1.2.3- Características do Sistema imune das aves	13
1.2.4- Diversidade das Imunoglobulinas.....	14
1.2.5- Transferência da IgY para a gema para progênie.....	14
1.2.6- Propriedades Físico-químicas da IgY.....	15
1.2.7- Vantagens da utilização da IgY.....	16
1.2.8- Produção de IgY.	19
1.2.8.1- Utilização de <i>Gallus gallus</i> como animal de experimentação.....	19
1.2.8.2- Imunização das aves	19
1.2.9- Obtenção da IgY.....	21
1.2.9.1- Formação do ovo e composição da gema.....	21
1.2.9.2- Métodos de isolamento e purificação de IgY.....	22
1.2.10- Aplicações da IgY em Biotecnologia.....	24
1.2.11- Relevância da utilização da IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	27

2- Objetivos.....	29
2.1- Objetivo Geral.....	29
2.2- Objetivos específicos.....	29
3- Material e Métodos.....	30
3.1- Delineamento do estudo.....	30
3.2- Obtenção da imunoglobulina Y (IgY) anti-IgG canina de ovos de galinhas imunizadas.....	30
3.2.1 – Desenho experimental.....	30
3.2.2 – Hiperimunização das aves.....	30
3.2.3 - Isolamento da IgY.....	31
3.2.4- Determinação da concentração de IgY e avaliação do perfil de produção de IgY anti-IgG canina após a imunização.....	31
3.2.5-Purificação da IgY por adsorção tiofílica.....	31
3.2.6- Caracterização da IgY por SDS-PAGE.....	32
3.2.7- Avaliação do perfil de produção de IgY anti-IgG canina específica por ELISA.....	32
3.2.8-Verificação da especificidade da IgY frente a IgG canina.....	32
3.2.8.1- Imunodifusão radial dupla.....	32
3.2.8.2- ELISA.....	32
3.2.8.3- <i>Western blot</i>	33
3.3-Produção do conjugado IgY-HRP.....	33
3.3.1- Conjugação da IgY purificada com peroxidase de rabanete (HRP)	33
3.4- Desenvolvimento e avaliação do ELISA utilizando IgY-HRP para LVC e comparação com ELISA convencional que utiliza IgG-HRP.....	34
3.4.1- Grupo de estudo utilizado.....	34
3.4.2- Tamanho da Amostra.....	35
3.4.3- ELISA para leishmaniose visceral canina utilizando IgY como conjugado enzimático (ELISA IgY-HRP)	35
3.4.3.1- Obtenção do antígeno para utilização em testes de ELISA.....	35
3.4.3.1.1- Crescimento e manutenção <i>in vitro</i> da cepa de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	35
3.4.3.1.2- Obtenção do extrato bruto total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> para o ELISA.....	36
3.4.3.2- Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) utilizando IgY-HRP como conjugado (ELISA IgY-HRP).....	36

3.4.3.2.1- Avaliação e titulação do conjugado IgY-HRP.....	37
3.4.4- Teste diagnóstico comparativo para avaliação da qualidade.....	37
3.4.4.1- Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) utilizando IgG-HRP como conjugado (ELISA IgG-HRP).....	37
3.4.4.2- Avaliação e titulação do conjugado IgG-HRP.....	38
3.5- Análise estatística.....	38
4- Resultados.....	41
4.1- Efeitos da imunização na biologia dos animais.....	41
4.2- Rendimento da produção de IgY.....	41
4.3 -Perfil da IgY por SDS PAGE.....	43
4.4 -Verificação da especificidade da IgY frente a IgG canina.....	45
4.4.1- Imunodifusão Radial dupla.....	45
4.4.2- ELISA.....	46
4.4.3- <i>Western-blot</i>	46
4.5- ELISA para leishmaniose visceral canina utilizando IgY como conjugado enzimático.....	47
4.5.1- Avaliação e titulação do conjugado IgY-HRP e IgG-HRP.....	47
4.5.2- Avaliação dos parâmetros de acurácia do ELISA utilizando IgY-HRP como conjugado para LVC.....	49
4.5.3- Avaliação dos parâmetros de acurácia do ELISA utilizando IgG-HRP como conjugado para LVC.....	50
4.5.4- Correlação entre as duplicatas do ELISA IgG-HRP e ELISA IgY-HRP nas duas observações realizadas.....	51
4.5.5- Análise da repetibilidade do ELISA-IgG-HRP e ELISA IgY-HRP.....	54
4.5.6- Comparação dos parâmetros de acurácia para o ELISA IgY-HRP e o ELISA IgG-HRP.....	55
5- Discussão.....	58
6- Conclusões.....	70
7- Bibliografia.....	71
8- Anexos.....	94

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1- Distribuição geográfica mundial da Leishmaniose Visceral.....	3
Figura 1.2- Mapa de estratificação das áreas de transmissão de Leishmaniose Visceral no Brasil segundo município de residência e média de casos de 2007 a 2009	4
Figura 1.3: Representação esquemática da estrutura molecular da IgG de coelho e da IgY de galinhas	12
Figura 1.4- Sistema reprodutivo de aves (galinha)	22
Figura 4.1: Concentração de IgY medida por espectrofotometria a 280 nm, após a imunização completa. As barras representam o desvio padrão.....	42
Figura 4.2: Produção de IgY isolada anti-IgG canina específica, por ELISA, após a imunização completa. As barras representam o desvio padrão.....	43
Figura 4.3 -Análise por SDS-PAGE em condições de redução da IgY anti-IgG canina, após isolamento com PEG.....	44
Figura 4.4: Perfil do processo de purificação da IgY utilizando o sistema Hitrap (GE-Healthcare)	45
Figura 4.5: Análise por <i>western-Blot</i> da reatividade IgY purificada anti-IgG canina com IgG purificada de diferentes espécies e soro de cão clinicamente saudável.....	47
Figura 4.6- Correlação entre as leituras das duplicatas (ABS1 e ABS2) nas duas observações realizadas para o ELISA-IgY-HRP.....	52
Figura 4.7- Correlação entre as leituras das duplicatas (ABS1 e ABS2) nas duas observações realizadas para o ELISA-IgG-HRP.....	53
Figura 4.8- Gráfico da análise de repetibilidade do ELISA IgY-HRP.....	54
Figura 4.9- Gráfico da análise de repetibilidade do ELISA IgG-HRP.....	55

Figura 4.10- Curva ROC do ELISA IgY-HRP e do ELISA IgG-HRP.....	56
Figura 4.10- Curva ROC do ELISA IgY-HRP e do ELISA IgG-HRP.....	56
Figura 4.11- Distribuição dos valores das absorbâncias das médias das duas observações realizadas para o ELISA IgY-HRP.....	56
Figura 4.12- Distribuição dos valores das absorbâncias das médias das duas observações realizadas para o ELISA IgG-HRP.....	57
Tabela 1.1: Vantagens da IgY como um imunoreagente.....	26
Tabela 4.1- Resultados da avaliação e titulação da IgY-HRP. Representação da UA, das leituras em ABS das amostras e do branco frente as respectivas concentrações de antígeno e diluições do conjugado testadas.....	48
Tabela 4.2- Resultados da avaliação e titulação da IgG-HRP. Representação da UA, das leituras em ABS das amostras e do branco frente as respectivas concentrações de antígeno e diluições do conjugado testadas.....	49
Tabela 4.3: Parâmetros de acurácia do ELISA para LVC utilizando IgY-HRP como conjugado.....	50
Tabela 4.4: Parâmetros de acurácia do ELISA para LVC utilizando IgG-HRP como conjugado.....	50
Tabela 4.5- Coeficiente de correlação através do teste de Pearson entre as leituras em absorbância das duplicatas do ELISA IgY-HRP e ELISA IgG-HRP nas duas observações realizadas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs- Absorbância.

ACF- Adjuvante completo de Freund's.

AIF- Adjuvante incompleto de Freund's.

BHI- Infusão de cérebro e coração (*Brain heart infusion*).

BSA- Albumina de soro bovino.

CEUA- Comissão de ética no uso de animais.

CH- Cadeira pesada.

CL- Cadeira leve.

Curva ROC- Curva de características de operação do receptor (*Receiver operating characteristic*).

DAB - 3,3'-diaminobenzidina.

ELISA- Ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

FITC- Isotiocianato de fluoresceína.

HRP- Peroxidase de rabanete.

IC- Intervalo de confiança.

ICC- Intervalo de correlação intraclasse.

Ig- Imunoglobulina.

IgG-HRP- Imunoglobulina G conjugada a peroxidase.

IL- Interleucina.

im- Intramuscular.

kDa- kilodaltons.

Kg- Quilograma.

LV- Leishmaniose visceral.

LVC- Leishmaniose visceral canina.

M- Molar.

Mab- Anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*).

µg- Microgramas.

mg- Miligramas.

mL- mililitros.

mM- milimolar.

nm- Nanômetros.

NNN- Agar-sangue modificado, (*Novy-MacNeal-Nicolle*).

PBS-Salina tamponada com fosfato.

PCR- Reação de polimerase em cadeia (*Polymerase chain reaction*).

PEG- Polietilenoglicol.

pH- Potencial hidrogeniônico.

RFLP- Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico (*Restriction fragment length polymorphism*).

rpm- Rotação por minuto.

SPF- Livre de patógenos específicos (*Specific pathogen free*).

SPSS- *Statistical Package for Social Science*.

TMB - 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina.

UA- Unidade arbitrária.

V- Volts.

VPN- Valor preditivo negativo.

VPP- Valor preditivo positivo.

1- Introdução

1.1- Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) humana, conhecida como calazar, é causada por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. É uma doença importante, disseminada por áreas tropicais e subtropicais do mundo¹. A sintomatologia humana é variável, podendo ocorrer desde casos assintomáticos até o calazar clássico que se caracteriza por emagrecimento progressivo, caquexia, febre intermitente, mal estar, anemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada, anasarca, hipergamaglobulinemia e progressiva imunossupressão celular².

1.1.1- Transmissão e ciclo biológico

A transmissão ocorre através da picada da fêmea do vetor das espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi*, nas Américas e do gênero *Phlebotomus* das espécies *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. neglectus* no Velho Mundo^{1,3}. Diversos podem ser os hospedeiros vertebrados da LV. Na Índia e no Sudão, a doença, que é causada por *L. (L.) donovani* é uma antrozoose, transmitida de humano para humano através da picada do vetor infectado⁴. Nas Américas e no mediterrâneo, a doença que é causada por *L. (L.) infantum chagasi*⁵ é uma zoonose de canídeos (leishmaniose visceral zoonótica). Nos ambientes silvestres, canídeos como raposas (*Dusicy onvetulus* e *Cerdocy onthous*) e o marsupial (*Didelphis albiventris*) são considerados as principais fontes de infecção⁶. Nos ambientes domésticos o cão apresenta-se como a principal fonte de infecção⁷.

O parasito apresenta-se de duas formas diferentes durante o seu ciclo de vida: promastigota ou forma extracelular, flagelada presente no vetor invertebrado e amastigota, a forma intracelular sem flagelo livre presente no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado¹. O ciclo biológico tem início quando o vetor invertebrado, durante a alimentação, ingere em uma fonte de infecção as formas amastigotas, estas serão liberadas no estômago do vetor, aderindo-se, multiplicando-se e transformando-se em promastigotas. Numa próxima alimentação, juntamente com a saliva dos flebotomíneos, os promastigotas serão transferidos para um novo hospedeiro vertebrado, estabelecendo-se em células do sistema fagocítico mononuclear, onde se transformam em amastigotas⁸.

1.1.2- Leishmaniose Visceral Canina

A LV é o melhor exemplo de doença natural de ocorrência focal ⁴, pois o ciclo entre raposas e canídeos silvestres é mantido por flebotomíneos silvestres de forma equilibrada. As raposas são muito importantes na disseminação da doença para ambientes domésticos e peridomésticos, por serem animais de comportamento migratório constante. Devido a sua necessidade de conseguir alimento, chegam até as proximidades dos ambientes domésticos, onde acabam por servir de fonte de infecção para os flebótomos que podem transmitir os parasitos para outros vertebrados, principalmente os cães. Os cães por sua vez, servirão de fonte de infecção doméstica para o vetor, que podem infectar o homem ⁹.

A transmissão de *L. (L.) infantum chagas i*⁵ em cães se dá por picadas de flebótomos, sendo descrita pela primeira vez em 1937 ¹⁰, depois, inúmeros trabalhos descreveram a importância do cão como reservatório primário da LV como zoonose ^{11, 12, 13}. Cães, em áreas endêmicas têm uma grande prevalência de infecção e infecciosidade ¹⁴, podem apresentar infecções duradouras ¹⁵ e estão em contato direto com o homem, tanto no domicílio, quanto no peridomicílio.

Fatores como idade e sexo parecem não estar relacionados a susceptibilidade na transmissão ao cão ¹⁶. Esta parece estar relacionada a polimorfismo de fatores genéticos. Solano-Gallego et al.¹⁷ demonstraram que cães da raça Ibizian hound, que vivem em áreas endêmicas, apresentam resistência natural a leishmaniose visceral canina (LVC) e raramente apresentam a doença clínica. A presença do gene NRAMP 1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) em cães pode caracterizar susceptibilidade ou resistência à leishmaniose. Este gene codifica para síntese de proteína transportadora de íons importante no controle da replicação intra-fagolisossomal de vários agentes etiológicos, entre eles a *Leishmania*. Mutações no gene NRAMP 1 em cães culminam na susceptibilidade à doença ¹⁸. Quinnell et al.¹⁹, descreveram a relação entre os alelos DLA (DRB1, DQA1, DQB1) de MHC-II e o curso da infecção, demonstrando que a presença do genótipo DLA-DRB1 em cães está associado a níveis aumentados de IgG e presença de parasitos no PCR, confirmando o papel desse locus na susceptibilidade da doença canina ¹⁹.

Ocasionalmente pode ocorrer a transmissão da doença por meios que não envolvam o vetor artrópode, como transmissão por meio de transplantes ou por via

transplacentária ²⁰. Em cães já está provada a transmissão via transfusão, prática cada vez mais frequente na clínica veterinária, principalmente devido à falta de monitoramento de doadores ²¹, entretanto, o significado desses achados necessitam ainda ser determinados ⁵.

1.1.3- Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses são endêmicas em 98 países ou territórios (Figura 1.1), existindo 350 milhões de pessoas em risco de contaminação. São estimados 2 milhões de casos novos ao ano. Desses, 500.000 casos novos anuais correspondem à LV, que causa no mundo 50.000 mortes ao ano, o que somente é superado, entre as doenças parasitárias, pelas estatísticas da malária. A LV atinge regiões da África, Índia, Américas (Central e Sul), Europa, Oriente Médio e China. Em regiões mais pobres, países em desenvolvimento, como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão estão concentrados 90% dos casos registrados no mundo. Na América Latina, a LV ocorre predominantemente no Brasil ⁵.



Figura 1.1- Distribuição geográfica mundial da Leishmaniose Visceral (fonte: WHO ⁵).

No passado a doença no país apresentava caráter rural, a maioria dos casos eram registrados nas áreas rurais das grandes cidades ⁶. No período entre 2003 e 2009 (Figura 1.2), foram registrados 34.583 casos de LV no Brasil. Em 2009, 47,5% dos casos humanos foram registrados no Nordeste, 19,2% na região Norte, 17,4% no Sudeste,

7,4% no Centro-Oeste e 0,2% no Sul, atingindo 21 unidades federadas e as cinco regiões do país ²². Atualmente, com aumento de casos nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, detectados predominantemente em áreas urbanas e periurbanas foi demonstrada uma mudança de perfil da LV no país de doença rural para doença urbana.

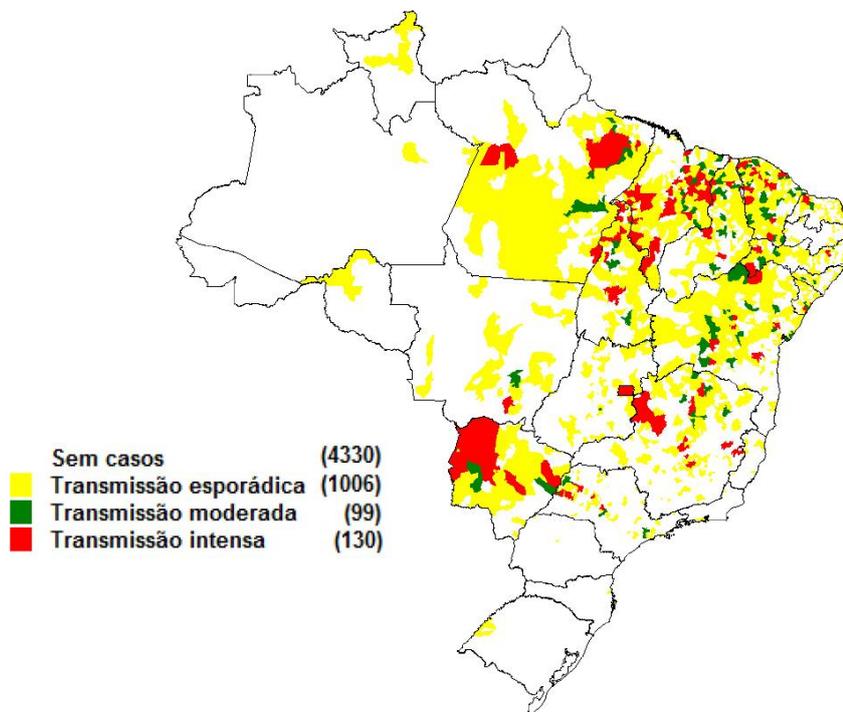


Figura 1.2- Mapa de estratificação das áreas de transmissão de Leishmaniose Visceral no Brasil segundo município de residência e média de casos de 2007 a 2009 (fonte: SVS-Ministério da Saúde ²²²).

Essa adaptação e passagem da doença rural para urbana, associada a fatores de risco como: status imunológico (doenças imunossupressoras, alimentação inadequada) e tratamentos ineficientes, causando resistência dos parasitos ²³, tornam a LV uma doença de caráter emergente e um problema constante de saúde pública. Essa mudança ocorreu devido a fatores como a urbanização crescente, modificação do ambiente com construção de estradas e migração da população ⁶ além da variabilidade genética de vetores e hospedeiros envolvidos ⁷. Algumas espécies de flebotomíneos muito presentes nas Américas, *L. (L.) shannoni* e *L. (L.) youngi*, podem se infectar e transmitir o parasito, quando existe a disponibilidade de fontes de infecção, transformando áreas não afetadas em endêmicas ⁷.

1.1.4- Controle da Leishmaniose Visceral

O Brasil é o único país endêmico para LV que desenvolve um programa sistemático de controle epidemiológico e profilático desde 1980¹⁶. Os métodos de controle utilizados no Brasil são: tratamento de casos humanos; eliminação de cães soropositivos e controle de vetor em ambientes domésticos e peridomésticos, com a utilização de inseticidas de efeito residual¹⁴. A eutanásia de cães infectados não é aceita na Europa²⁴, sendo uma técnica de eficácia também discutida no Brasil¹⁶, tanto por razões éticas, sociais, como pelo baixo impacto na redução da transmissão^{24, 25, 7}). A eutanásia de cães soropositivos é utilizada ainda, devido ao fato da quimioterapia para cães não ser recomendada pela Organização Mundial da Saúde, pelo crescente número de casos de resistência aos quimioterápicos observados em humanos²⁶. A identificação com consequente eutanásia de um cão infectado pode ser feita levando em consideração a associação de fatores epidemiológicos, clínicos e diagnósticos. Neste contexto, o conhecimento destes fatores tornam-se dados importantes para auxiliar as ações de controle da doença⁶.

As normas do Ministério da Saúde no Brasil determinam que o ELISA deve ser utilizado como diagnóstico de triagem e a imunofluorescência indireta (titulação $\geq 1:40$) como diagnóstico confirmatório, optando-se ainda, pelo uso de soros toda vez que a sua coleta e transporte for possível⁶. A falta de eficácia do controle preconizado no Brasil se deve em parte à baixa sensibilidade do teste diagnóstico por imunofluorescência indireta realizada através de eluatos que são coletados a partir de sangue periférico dos cães embebidos em papel de filtro. É reconhecida a maior sensibilidade do ELISA sobre a imunofluorescência indireta¹⁵ e do uso de soros em lugar de eluatos de sangue^{16,6}.

O tempo prolongado entre o diagnóstico e a remoção do cão infectado, a dificuldade de coleta do maior número possível de amostras caninas^{16, 25,20} e a recusa dos donos dos cães na hora da remoção¹⁴, são dificuldades constantes no controle da doença no Brasil. Não menos importantes, são as oscilações políticas, administrativas e econômicas que prejudicam a realização do programa de controle de forma efetiva. Por todas as razões descritas, novas estratégias são necessárias para um controle efetivo e uma das principais seria o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, obtidos de forma mais simplificada e aplicáveis em larga escala.

1.1.5- Clínica na Leishmaniose Visceral Canina

Os cães infectados podem apresentar diversas sintomatologias desde mais leves até as mais graves, como podem apresentar também ausência de sintomas ²⁷. Desta forma os cães infectados podem ser classificados como: assintomáticos (ausência de sintomas), oligossintomáticos (os cães apresentam de 1 a 2 sintomas) e sintomáticos (apresentam acima de 3 sintomas) ²⁸. Cães infectados com *L. (L.) infantum chagasi* ⁵, que apresentam quadro assintomático, resistem por longos períodos ou desenvolvem poucos sintomas podendo se curar espontaneamente ¹⁵, porém, tanto casos de cães sintomáticos ou assintomáticos podem culminar na eutanásia dos cães afetados ²⁹. O período de incubação da doença canina é muito variável, podendo ocorrer de meses até anos após a infecção ³⁰.

Os principais sinais presentes em cães doentes podem ser inespecíficos como febre por longos períodos, ou sinais clássicos e graves como a progressiva perda de peso até a caquexia. Lesões dermatológicas são as mais comuns manifestações descritas e incluem desde perda de pêlos localizada até generalizada e presença de úlceras de pele. Podem ser detectadas também: onicogribose; lesões oculares como conjuntivite, ceratites e blefarites; glomerulonefrite devido ao depósito de complexos imunes; hepatite crônica devido à multiplicação de amastigotas em macrófagos com aumento do órgão, formação de granulomas em fígado e baço ^{31,32}; linfadenomegalia generalizada, observada clinicamente em linfonodos cervicais, poplíteos e esplenomegalia ²⁷. Lesões ocorrem principalmente em órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como fígado, rins, linfonodos, medula óssea, pele e trato gastrintestinal, geralmente com inflamação crônica ²⁷. As coinfeções estão presentes em muitos casos (leishmaniose tegumentar, babesiose, erlichiose, parasitos intestinais, dirofilariose, leptospirose) sendo relatadas como comuns, agravando ainda mais o estado clínico do cão ³².

Cães sintomáticos geralmente apresentam altos níveis séricos de anticorpos específicos que podem ser facilmente identificáveis ^{25,33}. Entretanto, a sensibilidade de detecção de anticorpos geralmente é baixa em cães assintomáticos ou em estágio inicial de infecção ³⁴, sendo essa uma consideração muito importante, já que em área endêmica ocorre alta prevalência de casos de cães assintomáticos ³⁵, que pode ser de mais de 50% ³⁶, além da possibilidade desses animais permanecerem assim por períodos indeterminados ou até por toda a vida ³⁶, sendo o diagnóstico nesses casos imprescindível devido a infecciosidade desses cães para o vetor ³⁷. O curso clínico da

LVC está ligado a fatores como, a ocorrência e a quantidade dos flebotomíneos, fatores intrínsecos dos parasitos envolvidos, principalmente relacionados a virulência das cepas e a predisposição genética e imunológica do hospedeiro ³⁰.

1.1.6- Resposta imune humoral na Leishmaniose Visceral Canina

Na LVC é relatada a presença de uma forte resposta imune humoral. Cães infectados apresentam níveis séricos aumentados de anticorpos, principalmente da classe IgG, embora o aumento de imunoglobulinas, não esteja correlacionado a proteção ³⁴ e sim a sintomatologia ²⁵. Além disso, foi demonstrada uma correlação entre presença de sinais clínicos, presença de parasitos com resposta de anticorpos fortemente soropositiva ²⁵, demonstrando que a detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* mostra ser eficaz na identificação de cães infectados.

De acordo com Deplazes et al. ³⁸ níveis séricos altos de anticorpos IgG1 apresentam-se significativamente aumentados em cães infectados, estando correlacionado com a gravidade da doença e presença de sinais clínicos, enquanto a IgG2 pode ser detectada em cães clinicamente normais naturalmente resistentes a infecção, assintomáticos. Entretanto estes resultados são controversos e diversos estudos demonstraram diferentes perfis relacionados a subclasses de IgG na LVC ^{39, 40, 31, 41, 42, 43}. Segundo Day ⁴⁴ todos esses estudos foram realizados utilizando anticorpos policlonais anti-IgG1 e anti-IgG2 e a qualidade destes nestas condições torna-se discutível por não apresentarem a especificidade necessária. Quando testados por seu grupo, foram demonstradas reações cruzadas destes anticorpos com outras quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) purificadas por PCR-RFLP ⁴⁴.

A resposta mediada por IgA, foi encontrada em altos níveis em cães que sofrem da doença de forma aguda, estando sua produção relacionada ao intenso parasitismo nos diferentes tecidos, pois é produzida quando o parasito se espalha por diferentes partes do corpo, inclusive mucosa ⁴⁵. A resposta de IgM, ocorre de forma mais tardia, após aparecimento da resposta IgG, demonstrando não ser bom marcador de fase aguda ⁴⁵. Mais recentemente foi demonstrada a presença de resposta por anticorpos da classe IgE em cães sintomáticos demonstrando a possível utilização desta classe como marcador ativo da doença ^{31 46}.

Pode-se dizer que a infecção de animais sintomáticos está relacionada a altos níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania* das classes IgG, IgE e IgA ^{46, 41}. Entretanto,

correlação destas imunoglobulinas e subclasses de IgG como marcadoras de resistência ou suscetibilidade ainda é considerada controversa não sendo descrito ainda um claro padrão de comportamento frente a infecção ⁴⁴.

1.1.7- Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico precoce da doença tem se mostrado útil no controle epidemiológico e na redução de casos humanos e caninos ⁴⁷. As técnicas de diagnóstico para a LVC se baseiam além dos sinais clínicos, em métodos parasitológicos, moleculares e imunológicos ³.

A detecção direta do parasito, ainda é o método de escolha para o diagnóstico ⁴⁸. Embora alguns desses procedimentos ofereçam simplicidade, são caracterizados por serem invasivos, significando a ocorrência de riscos para os animais como também impraticáveis em programas de saúde pública, em que um grande número de animais necessita ser analisado num curto espaço de tempo. Trata-se de um método seguro de diagnóstico, que apresenta 100% de especificidade uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta das formas amastigotas. Entretanto a sensibilidade deste depende do grau de parasitismo dos animais analisados, do tipo de material biológico a ser coletado, do tempo de análise dessas lâminas e do treinamento do observador ⁶.

As formas amastigotas podem ser detectadas através de material retirado de biópsias cutâneas, punções ou fragmentos de órgãos alvo como baço, fígado, medula óssea e de linfonodos cervicais e/ou poplíteos, corados pelo método de Giemsa ou hematoxilina e eosina ⁴⁹. Para detecção do parasito são utilizados ainda, os métodos de amplificação por cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirados de tecidos inoculados em meio NNN bifásico, ou ainda a cultura *in vivo*, em que material infectado é inoculado em modelos experimentais apropriados, normalmente hamsters ⁴⁹.

O método molecular mais utilizado para o diagnóstico da LVC, porém pouco utilizado na prática, é a reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizada no diagnóstico de diferentes doenças parasitárias, incluindo a leishmaniose. É baseada na amplificação de sequências específicas do parasito. É um método sensível, específico e rápido que pode ser utilizado em diferentes amostras biológicas incluindo, amostras de sangue, linfonodos, medula óssea e pele ³.

Em áreas endêmicas o diagnóstico da doença é extremamente desafiador, devido à possível ocorrência de diversas e não específicas manifestações clínicas como também a existência de uma grande quantidade de cães com alta soroprevalência em estado subclínico. Vale ressaltar também, que a soroconversão em cães naturalmente infectados ocorre em média 94 dias após a infecção²⁵ seguida de período latente de 105 dias, demonstrando que existe um período de 199 dias entre infecção e infecciosidade dos cães²⁵. No caso da LVC este é um dado muito importante, pois o controle é realizado através de métodos de avaliação de anticorpos. A existência deste período de infecção inaparente nos cães pode acarretar falhas durante o inquérito soropidemiológico. A existência de técnicas sorológicas mais sensíveis se torna então imprescindível.

Devido à ocorrência em cães infectados de uma alta correlação entre sintomatologia, infecciosidade e resposta fortemente soropositiva²⁵, os métodos sorológicos demonstram ser seguros e eficazes como métodos diagnóstico na LVC. Os testes sorológicos convencionalmente mais utilizados são o ELISA, a imunofluorescência indireta, a aglutinação direta e o *western blot*⁵⁰. As técnicas sorológicas utilizadas como método diagnóstico de escolha em inquéritos epidemiológicos, no Brasil, são o ELISA e a imunofluorescência indireta⁶. Os métodos imunológicos se baseiam na detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro dos cães infectados³⁰.

Os métodos sorológicos para LV demonstram especificidade e sensibilidade elevadas, o que é particularmente desejável. Embora tenham ocorrido avanços, são descritos ainda, problemas de reações cruzadas com outras doenças como: leishmaniose cutânea canina, tripanossomíases, erlichiose, rickettsiosis e toxoplasmose^{32, 3, 51}. Por esta razão, métodos com níveis mais adequados e mais modernos, com uma maior sensibilidade e especificidade são desejáveis.

A imunofluorescência indireta é considerada padrão ouro, a técnica de referência no diagnóstico da LVC^{49,50,3,52}. É um teste de análise quantitativa⁵³ que apresenta baixa especificidade, exige pessoal treinado e equipamentos específicos, sendo uma reação dispendiosa, não adequada em larga escala⁵⁴ e de interpretação subjetiva⁵⁵. Apresenta como uma de suas principais limitações a ocorrência de reações cruzadas com outras doenças como leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, toxoplasmose e erlichiose^{32,51,3}. Outro problema está na presença de uma grande janela de detecção em casos de

doença inicial, ou seja, um período de incerteza, sendo o teste pouco eficaz na detecção de casos precoces ⁵⁵.

O Elisa é a metodologia mais utilizada, por ser um teste rápido, de fácil execução, leitura e de fácil adaptação a diversos antígenos. Pode ser utilizado para um grande número de amostras, em inquéritos epidemiológicos ⁵². Em comparação com a imunofluorescência indireta, é considerado um método mais sensível embora seja menos específico. Permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, sendo pouco preciso para detecção no caso cães em estágio subclínico e ainda em cães assintomáticos ⁵⁶. É um método quantitativo, o que limita a subjetividade na interpretação dos resultados ⁴⁹. Apesar da elevada capacidade de detecção dos ensaios enzimáticos, um fator determinante para bons resultados é a natureza do antígeno empregado.

Os métodos de diagnóstico sorológico são ainda, as ferramentas mais realistas e aplicáveis nas pesquisas epidemiológicas e clínicas para identificação de cães infectados ⁵⁷, portanto, devem demonstrar adequada especificidade e sensibilidade, evitar resultados falso positivos ou negativos, que podem levar a transmissão da doença canina e humana ou a eutanásia desnecessária de um cão normal ^{32,3,51}. A pesquisa de métodos mais eficientes e ao mesmo tempo melhor aplicáveis, principalmente em larga escala, torna-se importante no intuito de identificar o reservatório canino, o que é primordial para o controle da doença canina e conseqüentemente a humana ¹⁴.

Uma abordagem para pesquisa de métodos novos seria o desenvolvimento de anticorpos policlonais desenvolvidos em aves (IgY). Diferentes pesquisas demonstram a excelente qualidade da IgY como imunorreagente, apresentando uma efetividade igual a IgG de mamíferos ou até mesmo superior ⁵⁸. A produção de IgY em alternativa a IgG de mamíferos enquadra-se muito bem nesse perfil, demonstrando ser uma alternativa vantajosa aos anticorpos policlonais produzidos em mamíferos, adequando-se muito bem a produção em larga escala, de baixo custo e levando em consideração questões éticas, cada vez mais discutidas nas investigações científicas ⁵⁹.

1.2- A imunoglobulina Y

1.2.1- Histórico da Imunoglobulina Y

Em 1893 Kemplerer demonstrou pela primeira vez a transferência passiva de anticorpos da galinha para ovo ⁶⁰. Essa descoberta ficou esquecida até 1959 quando Russel & Bruch descreveram uma técnica de purificação de anticorpos utilizando ovos de galinha como alternativa a técnica utilizada para produção de IgG em mamíferos ⁶¹. Dez anos depois, em 1969 Leslie & Clem aprofundaram estudos na purificação e caracterização da imunoglobulina produzida por galinhas, que por sua similaridade com IgG de mamíferos também era chamada de IgG aviária. Além disso, demonstraram a diferença entre as duas e a produzida por galinhas passou a ser chamada de IgY por ser proveniente da gema dos ovos, devido a expressão de origem inglesa *egg yolk* ⁶². Nos anos seguintes, os resultados de Klemperer foram ganhando mais importância na medida em que o bem-estar animal tornou-se uma preocupação. Nos anos 1980 ocorreu um aumento nas aplicações comerciais da IgY. Em 1996, o grupo do *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)*, recomendou o uso da IgY em alternativa ao uso da IgG de mamíferos ⁵⁹. Em 1999, a Tecnologia IgY foi aprovada como método alternativo de melhorar o bem estar animal, pelo *Office Vétérinaire Federal* na Suíça. Atualmente a IgY vem sendo utilizada tanto de forma comercial como na pesquisa científica, onde é objeto de estudo devido ao seu potencial de utilização tanto na imunoterapia quanto no imunodiagnóstico ⁶³.

1.2.2- Estrutura molecular da IgY

A IgY é um anticorpo policlonal descrito como imunoglobulina predominante no soro das aves, embora apresente-se em maior concentração na gema que no soro ⁶⁴. A IgY é encontrada em aves, peixes, répteis, anfíbios e provavelmente em alguns peixes pulmonados, o que a diferencia da IgG que só pode ser encontrada em mamíferos. É considerada imunoglobulina ancestral da IgG, IgA e IgE de mamíferos ⁶⁵, entretanto a IgY difere da IgG por ser capaz de mediar reações anafiláticas ⁶⁰.

Quanto a estrutura tanto a IgY como a IgG possuem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas (Figura 1.3). A maior diferença entre as duas moléculas é o número das regiões constantes da cadeia pesada: a IgG apresenta 3 regiões constantes ($C_{H1}-C_{H3}$), enquanto a IgY apresenta 4 regiões constantes ($C_{H1}-C_{H4}$) ⁶⁵. Não existe ainda um consenso sobre o peso molecular da IgY, mas a maioria dos autores consideram como

sendo de ~180 kDa ^{65, 66, 67, 58} maior que o peso da IgG que é 150 kDa. Tal diferença deve-se a região constante adicional e a presença de carboidratos desta ⁶⁸. A cadeia leve é formada por uma região constante e outra variável (C_L e V_L) e as ligações dissulfeto, responsáveis pela estabilização da cadeia leve (entre C_L e V_L) estão ausentes, o que torna as forças intermoleculares da IgY mais fracas em relação a IgG ⁶⁹. A cadeia pesada é formada por um domínio variável e quatro constantes. Na cadeia pesada da IgY os domínios C_{H3} e C_{H4} estão mais relacionados aos domínios C_{H2} e C_{H3} da IgG ⁶⁵. O domínio C_{H2} presente na estrutura da IgY está ausente na IgG, o qual provavelmente se condensa para formar a região da dobradiça na IgG ⁵⁸.

Outra diferença significativa da IgY em relação a IgG é a ausência da região da dobradiça, presente na IgG de mamíferos e responsável pela flexibilidade da porção Fab (porção responsável pela ligação antígeno e anticorpo). Em contraste, a IgY apresenta na cadeia pesada entre os domínios C_{H1} - C_{H2} e C_{H2} - C_{H4} resíduos de prolina e glicina que conferem certa flexibilidade a molécula ⁵⁸. A Fc da IgY também é responsável pela função efetora, como na IgG, esta apresenta carboidratos laterais nos domínios C_{H2} e C_{H3} , diferindo da IgG que apresenta somente na região C_{H2} ⁵⁸.

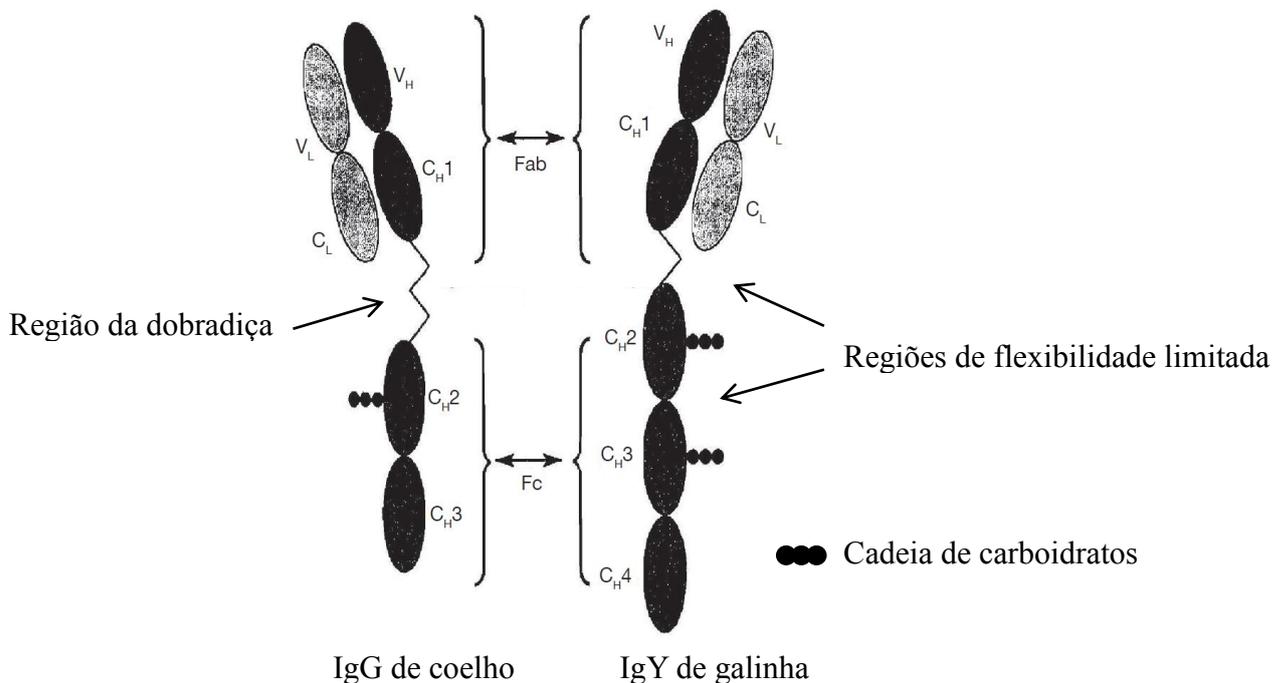


Figura 1.3: Representação esquemática da estrutura molecular da IgG de coelho e da IgY de galinhas (Modificado de Schade et al. ⁷⁰).

1.2.3- Características do Sistema imune das aves

O sistema imune das aves consiste em órgãos linfoides primários e secundários. O timo e a bursa de Fabricius são componentes dos órgãos linfoides primários. O baço, a medula óssea, glândula de Harder, tonsilas cecais, os tecidos linfoides associados de mucosa e nódulos linfáticos são componentes dos órgãos linfoides secundários⁷¹. Os nódulos linfáticos estão ausentes na galinha doméstica e no peru⁷². Como nos mamíferos, o sistema imune aviário também é dividido em dois componentes: o inato não específico e o adquirido, que se caracteriza pela especificidade, heterogenicidade e memória, que se divide em celular e não celular (humoral)^{63,58}.

O componente celular que é constituído por linfócitos T diferenciados no timo, apresentam uma população celular muito heterogênea responsável por diferentes funções, entre elas pode-se destacar: produção de linfocinas, destruição de organismos externos, atividade supressora e efetora, aumentando a resposta de macrófagos, outras células T e linfócitos B^{221,60}.

O componente não celular inclui os anticorpos e as células que os produzem, os linfócitos B. Estes são produzidos na fase embrionária no fígado e na medula óssea, e são diferenciados na Bursa de Fabricius, sendo deslocados para o sangue, fígado tonsilas cecais, medula, glândula de Harder e timo, gerando resposta com produção de anticorpos depois do quinto dia da exposição a um antígeno externo⁵⁸.

Da mesma forma que os mamíferos, quando as aves são expostas a um organismo estranho os macrófagos realizam a fagocitose, digerindo parcialmente moléculas proteicas desse organismo, apresentando em sua superfície um complexo formado por MHC de classe II e peptídeo, que será transportado por esse macrófago e expostos a linfócitos T (T-helper), os quais apresentam receptores específicos ao peptídeo apresentado. Posteriormente, esses linfócitos selecionam linfócitos B, que, uma vez ativados, diferenciam-se em plasmócitos produtores de anticorpos^{73,58}.

Três classes de imunoglobulinas podem ser encontradas nas aves: a IgM, IgA e a IgY. A IgM e IgA são similares as imunoglobulinas de mamíferos em estrutura, peso molecular e motilidade na eletroforese⁶⁰. A IgY representa cerca de 75% do total de imunoglobulinas das aves⁷⁴, sendo a de maior predominância no soro e na gema. A IgM é a segunda imunoglobulina mais encontrada no soro das aves⁷⁵, apresenta cadeia pentamérica e pode ser encontrada no soro e na parte branca do ovo (clara). A IgA

apresenta-se tanto da forma dimérica como monomérica, podendo ser encontrada na bile, nas secreções intestinais, nas secreções respiratórias e na parte branca dos ovos ²²¹. Porém, são encontrados somente traços no soro das aves ⁷⁵.

1.2.4- Diversidade das Imunoglobulinas

Os vertebrados tem a possibilidade de produzir um grande número de diferentes moléculas de anticorpos, isto ocorre através de um processo de recombinação e expressão dos genes presentes tanto na cadeia leve como na pesada ^{76, 77}. Através dos fragmentos gênicos V, D e J, pertencentes ao repertório celular ocorrem rearranjos e mutações responsáveis pelas diferentes especificidades frente aos diferentes antígenos ⁷⁸. Em mamíferos existe um grande número de segmentos gênicos V, D e J que durante o desenvolvimento inicial se rearranjam e recombina para a formação das regiões variáveis das imunoglobulinas ²²¹. Nas aves esse mecanismo funciona de forma diferente, o repertório é bem menor. As galinhas apresentam a cadeia leve codificada por somente um gene V e um gene J, além da região constante, já a cadeia pesada apresenta um gene J e outro V e 16 segmentos gênicos D além da região constante. Esses rearranjos geram uma pequena diversidade nas células B aviárias. As aves atingem a diversidade necessária utilizando sequências de pseudogenes (V ψ) doadores de sequências gênicas, que são inseridos na região V da cadeia pesada e leve em um processo denominado conversão gênica ^{79,80}. Outra diferença em relação aos mamíferos no processo de diversidade das imunoglobulinas, é que as aves somente rearranjam suas imunoglobulinas na bursa de Fabricius somente durante a embriogênese, enquanto os mamíferos podem fazê-lo durante toda sua vida de forma contínua ²²¹.

1.2.5- Transferência da IgY para a gema para progênie

Assim como os mamíferos, as aves transmitem imunidade a seus descendentes transferindo imunoglobulinas do soro para a gema ⁸¹. Esses anticorpos são transferidos durante a formação do ovo. São fatores de proteção durante o todo o desenvolvimento do embrião, o que sugere a ocorrência de imunização passiva ⁸². A IgY é secretada do sangue da ave para a gema, continuamente, através de endocitose, por meio da membrana folicular do ovário para a gema dos oócitos em maturação. ^{83, 84, 85, 86, 87}. A IgY é transferida por meio de um receptor específico (FcRY) presente na superfície da membrana do saco vitelínico ^{88,89}. A região Fc da IgY (região constante), região de flexibilidade sem a presença de carboidratos e a região com os domínios C_H2 e C_H3 são

reconhecidos pelo receptor responsável pelo transporte ⁸⁹. A passagem da IgY do sangue para o oócito demora aproximadamente de 3 a 6 dias ^{90 91}.

A IgY é transferida em maior quantidade do soro para gema quando comparada a IgM e a IgA que são transferidas em menor quantidade, por secreção mucosa das células do oviduto, estando presentes somente na parte branca do ovo ⁹². Esta baixa taxa de transferência pode ser explicada pela facilidade do transporte de imunoglobulinas monoméricas, como a IgY, melhor incorporadas pela membrana folicular. A formação de dímeros e pentâmeros formados pela IgA e IgM respectivamente dificulta essa absorção devido ao tamanho dessas moléculas resultando uma baixa infiltração na membrana folicular ⁷⁵.

1.2.6- Propriedades físico-químicas da IgY

A IgY demonstra uma menor estabilidade frente a condições ácidas quando comparadas a IgG de mamíferos, foi verificado que a atividade da IgY foi quase completamente perdida em pH 3 ^{93, 69, 94}. Essa perda de atividade gerou mudança na conformação da molécula e dano na ligação com antígeno. Sob condições alcalinas, a atividade da IgY foi muito similar a IgG, alterando-se somente em pH 12, quando sua atividade reduziu de forma significativa ^{93, 69, 94, 95,96}. Shin et al. ⁹⁷ encontraram resultados similares ao estudar a estabilidade da IgY tanto nas condições ácidas como alcalinas ⁹⁷.

Hatta et al. ⁹⁵ demonstraram que a IgY sob temperaturas de 60 °C por 3,5 minutos não tem sua atividade imunológica afetada. Shimizu et al. ⁹⁴ apresentaram resultados similares entretanto, demonstraram que a IgY perde grande parte de sua atividade a 70 °C. Segundo Shin et al. ⁹⁷ a IgY perdeu mais de 90% de sua atividade quando submetida a 80°C ^{98,97}. Estudos demonstram que alguns açúcares podem atuar como protetores em altas temperaturas, diminuindo a perda da atividade da IgY ^{99,100}.

Em relação às diferentes temperaturas de congelamento a IgY não tem sua atividade afetada, a não ser que esses processos de congelamento e/ou liofilização sejam repetidos ⁹⁴. Um ovo após postura pode ser estocado a 4°C por até 6 meses sem perda da atividade da IgY ⁶³. A IgY quando conservada a -20 °C pode permanecer por 12 meses com perda mínima de atividade ⁶³. Olovsson & Larsson, ¹⁰¹ demonstraram que a IgY estocada a 4 °C pode permanecer por anos sem perda de sua atividade.

A valência da IgY é a mesma que a da IgG de mamíferos ⁶⁵. A IgY é sensível a pepsina, perdendo toda sua atividade ⁹⁵, demonstrando uma maior sensibilidade a essa protease quando comparada a IgG da espécie bovina ⁹⁴, entretanto é resistente a proteases como a tripsina e quimiotripsina ⁹⁴. A IgY também é relativamente estável a pressão, não havendo inativação até 4.000kg/cm² ⁹⁹. O ponto isoelétrico da IgY (5,7-7,6) é menor quando comparado a IgG (6,1-8,5) ¹⁰². A região Fc da IgY é a parte mais hidrofóbica da sua estrutura. Em comparação com a IgG de mamíferos a IgY apresenta uma maior hidrofobicidade em sua molécula ¹⁰³, porém tem baixa habilidade de precipitar antígenos quando comparada a IgG de mamíferos, melhores resultados podem ser obtidos somente aumentando a concentração de sal ⁵⁹.

1.2.7- Vantagens da utilização da IgY

A Imunização de galinhas representa uma ótima alternativa para produção de anticorpos policlonais ¹⁰⁴. A IgY é uma excelente ferramenta no imunodiagnóstico por apresentar algumas características que conferem vantagens quando comparadas a IgG de mamíferos:

❖A IgY não se liga a receptores Fc de mamíferos

Os receptores Fc de mamíferos são encontrados em células sanguíneas ⁷⁸. A IgG de mamíferos tem a capacidade de ligação a esses receptores celulares e isto pode gerar um problema na interpretação de testes imunológicos pois, algumas vezes agregados de IgG podem ser formados tanto durante a purificação quanto no processo de conjugação com diferentes enzimas, o que aumenta a ligação IgG-recetorFc, gerando um aumento na cor de fundo desses testes ¹⁰⁵. A interação com receptores Fc pode causar ativação celular e mudança das proteínas de superfície, o que pode gerar problemas de interpretação quando imunoglobulinas de mamíferos são utilizadas na citometria de fluxo ¹⁰⁶. A IgY não se liga a esses receptores podendo ser utilizada em alternativa para resolver esse problema ⁶⁴.

❖A IgY não ativa o complemento e não se liga ao fator reumatóide

A capacidade da IgG ligar ao sistema complemento pode influenciar os resultados do ELISA, a cascata ativada pode levar o C4 a ligar com a região Fab da IgG de mamíferos podendo interferir com a ligação ao antígeno nessa região ¹⁰⁵. A IgY é

capaz de ativar o complemento de aves, mas não de mamíferos ⁶⁴, podendo ser utilizada para evitar esse problema.

Fatores reumatóides são autoanticorpos que reagem com fração Fc das IgG, sendo responsáveis por resultados falso-positivos nas diferentes reações imunológicas ⁷⁸. Como a IgY não apresenta a região Fc responsável por essa ligação, não causa resultado falso positivo ¹⁰⁷.

❖ A IgY não reage com proteína G de estreptococos e nem a proteína A de estafilococos

Essas proteínas são utilizadas como imunoabsorventes em ensaios imunológicos devido a habilidade de se ligarem a fração Fc da IgG de mamíferos. Podem ser encontradas como contaminantes em amostras bacterianas, ligando-se aos anticorpos detectores com especificidade e causando resultados falso positivos. ^{108, 109}. Foi demonstrado que IgY não reage com a proteína A ou com a proteína G, não interferindo, portanto, em testes imunológicos onde estas proteínas estão presentes ¹¹⁰.

❖ A distância filogenética entre aves e mamíferos

Devido a esta característica, as galinhas são capazes de produzir anticorpos específicos contra antígenos de mamíferos altamente conservados, diferentemente de coelhos ⁵⁹. Os antígenos conservados não geram resposta em mamíferos por permanecem “mascarados” (reconhecidos como próprios) para seu sistema imune causando uma resposta fraca ou ausente ⁶³. Essa distância contribui ainda para as diferentes especificidades de anticorpos entre essas duas espécies ⁷⁰. O sistema imune das aves reconhece mais facilmente os epítomos de proteínas de mamíferos. Além disso, as aves são capazes de detectar epítomos diferentes dos detectados por mamíferos ⁶⁸. A IgY é capaz de reconhecer epítomos de forma mais efetiva quando proteínas de mamíferos são utilizados com antígenos ¹¹¹, não gerando reações cruzadas entre antígeno-anticorpo, característica comumente descrita, nas imunoglobulinas produzidas por mamíferos ¹¹². Outra grande implicação disto, é a pouca reatividade cruzada que a IgY demonstra com a IgG de mamíferos ¹¹³.

❖ **As vantagens econômicas e operacionais**

Uma das principais vantagens econômicas e operacionais está relacionada à sua produção, que é contínua e em grande quantidade, durante todo o período de postura⁶³, aproximadamente dois anos¹¹⁴. Destaca-se ainda, a maior quantidade de anticorpos produzidos por galinhas imunizadas em comparação aos mamíferos de pequeno porte, como o coelho^{111, 115, 70, 114, 116}, comparando-se a produção de anticorpos de mamíferos maiores como cabras e ovelhas⁷⁰. Uma galinha produz de 5 a 7 ovos por semana, podendo chegar a produzir de 20 g de IgY/ano, com 1-10% de IgY antígeno específica^{117, 114}, um coelho, neste mesmo período, pode chegar a produzir 3 g de IgG¹¹⁶. Além de produzir IgY rapidamente e em grandes quantidades, galinhas mantém altos níveis de anticorpos específicos por um longo período¹⁰². Além da utilização de uma menor quantidade de antígeno requerido para imunização devido ao baixo peso corporal desses animais, reduzindo ainda mais o custo da produção¹¹⁸. Outra vantagem que se pode destacar na utilização de galinhas como animais de experimentação é a facilidade de manejo (criação e nutrição) em condições laboratoriais, além de um custo mais baixo de manutenção quando comparado com os mamíferos normalmente utilizados como doadores de anticorpos, principalmente os de grande porte, diminuindo os custos com mão de obra⁶³.

❖ **As vantagens éticas, relacionadas ao bem estar animal**

A utilização de galinhas para produção de anticorpos em alternativa a mamíferos na experimentação animal apresenta também vantagens éticas, enquadrando-se no princípio dos 3Rs⁶¹. A substituição (*replacement*) que se traduz em substituir mamíferos por aves. A redução (*reduction*) que é empregada quando uma quantidade mínima de galinhas é utilizada para produzir uma grande quantidade de anticorpos, o refinamento (*refinement*) é empregado quando as gemas são utilizadas como fonte de anticorpos suprimindo a invasividade de procedimentos aplicados⁵⁹, além de descartar a eutanásia comumente realizada quando mamíferos são utilizados como doadores de anticorpos⁶³.

1.2.8- Produção de IgY

1.2.8.1- Utilização de *Gallus gallus* como animal de experimentação

Mesmo apresentando diversas vantagens já descritas anteriormente, a produção de IgY ainda é pouco difundida, seja por falta de informação sobre sua produção e utilização, ou pela falta de costume da utilização de aves como animais de experimentação⁶⁸. Quando se fala em produção de anticorpos policlonais, geralmente ruminantes equinos e lagomorfos são os animais de escolha¹¹⁹. A ave doméstica acaba não sendo muito utilizada para este fim.

Ao utilizar aves como animal de experimentação, as condições do estabelecimento de abrigo devem levar em consideração o comportamento típico da espécie. Mantê-las em condições laboratoriais é mais desejável. A utilização de gaiolas individuais é mais recomendável, principalmente para o acompanhamento de parâmetros como a higiene, a identificação dos ovos, avaliação de estresse e efeitos colaterais decorrentes do processo de imunização⁷⁰. Devem-se deixar disponível para os animais água e ração à vontade. O contato visual com outros da mesma espécie é muito importante para esses animais^{119, 63}. O local de manutenção deve ser arejado e iluminado, alternando períodos de claro e escuro. Deve ser um local tranquilo e silencioso para que não sejam submetidos a estresses desnecessários que podem influenciar diretamente na saúde e na queda da postura¹¹⁹.

O uso de animais convencionais ainda é a melhor alternativa quando comparadas a animais SPF (livres de patógenos específicos), mais onerosos do ponto de vista estrutural e de manutenção. Além disso, a comparação da produção de anticorpos em aves SPF e convencionais, utilizando o mesmo protocolo de imunização, demonstrou ser compatível⁷⁰.

1.2.8.2- Imunização das aves

O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados por meio da purificação da gema dos ovos de galinhas poedeiras imunizadas com antígenos apropriados. De um modo geral, muitos tipos de antígenos podem ser utilizados para produzir IgY antígeno-específica, tais como: proteínas, bactérias, vírus, parasitos, fungos, polipeptídeos, hormônios, toxinas, entre outros⁷⁰. Diferentes fatores afetam o sucesso desse processo: a escolha do antígeno e do adjuvante, a via e o

intervalo das inoculações. A toxicidade do antígeno deve ser considerada antes do processo de imunização, a contaminação com produtos químicos, com resíduos da preparação ou pH extremos devem ser evitados ¹¹⁹. A concentração do antígeno deve estar combinada com o adjuvante ideal para que as respostas sejam satisfatórias ⁵⁹, a utilização da dose ideal é necessária, pois doses muito altas podem gerar supressão da resposta. Segundo Schade et al. ⁷⁰, as doses ideais recomendadas para imunização de galinhas giram em torno de 0,10 a 100 mg de antígeno. Pequenos antígenos como os peptídeos podem ser carregados com proteínas maiores e mais imunogênicas para o sucesso da resposta ⁷⁰.

O tipo e a qualidade do adjuvante são fatores de importância para determinar a resposta ideal que gere altos níveis de anticorpos tanto no soro quanto na gema ⁶³. O adjuvante completo de Freund's (ACF) é o mais efetivo, entretanto gera efeitos colaterais como danos teciduais, inflamação e dor, gerando estresse do animal devido a imunização e isto não é desejável. A utilização do adjuvante incompleto de Freund's (AIF) é uma alternativa, pois ele causa menos efeitos colaterais, entretanto sua resposta é menos eficiente ^{59,63,70}. Para que isso seja evitado, a combinação do ACF na primeira imunização e do AIF nas subsequentes é preferível para evitar efeitos adversos e induzir níveis elevados de IgY ^{120, 121, 58}. Outros tipos de adjuvantes têm sido estudados em alternativa ao ACF e AIF na imunização de aves ^{122,123,124,125}.

A via de imunização mais utilizada em aves para produção de IgY é a intramuscular ⁷⁰, por ser considerada uma das mais seguras ¹¹⁹, a musculatura do peito é a mais utilizada ⁵⁹. Também são descritas a utilização das vias subcutânea e endovenosa, somente quando antígenos puros sem a presença de adjuvantes são utilizados para imunização, de forma lenta para evitar o choque anafilático ^{59, 63,70}. O volume do inóculo utilizado para aves não pode ultrapassar 0,5 mL em cada ponto a ser utilizado ¹¹⁹ e preferencialmente deve ser dividido em vários pontos para evitar danos teciduais ⁵⁹. O intervalo entre as imunizações depende da resposta individual e tipo de antígeno e adjuvante utilizados. Normalmente para aves utiliza-se 10 dias de intervalo da primeira imunização para as subsequentes. Entretanto, a recomendação é que este intervalo seja de 4 semanas. O importante é que este não seja tão curto que resulte na imunodepressão do animal ^{63, 70}.

1.2.9- Obtenção da IgY

1.2.9.1- Formação do ovo e composição da gema

O sistema reprodutivo de uma galinha é constituído por ovário e oviduto (Figura 1.4). Nas aves domésticas sexualmente maduras, somente o ovário e o oviduto esquerdo são funcionais ¹²⁶. Os oocistos estão localizados no ovário, onde a gema é formada ⁷². Os constituintes da gema são sintetizados no fígado e transportados para o ovário através do sangue ¹²⁷, junto com as imunoglobulinas sintetizadas nos órgãos linfáticos ⁷⁵. Os oocistos tornam-se folículos após, receberem uma cobertura com a camada granular e são ovulados dentro do oviduto, onde recebem o albúmen e a casca. O oviduto é formado pelo infundíbulo, magnum, istimo, útero e vagina ⁷². O infundíbulo recebe o folículo ovulado, e é neste local que ele receberá outra camada de membrana vitelínica, a calaza, responsável por prender a gema aos pólos do ovo, além de ser coberto pelo albúmen, permanecendo por aproximadamente 18 minutos. No magno é onde 80% da albumina será recebida, onde o ovo em formação permanece por 3 horas. No istimo é onde o folículo (gema) recebe a membrana da casca. O processo final de formação da casca ocorre no útero, também chamado de glândula da casca, onde pode permanecer de 18 a 22 horas. Após processo de formação, o ovo passa pela vagina, local somente de passagem, alcançando a cloaca e é expelido ¹²⁷.

O ovo é formado por 9,5% de casca, 65% de albumina e 27,5% de gema, o maior constituinte da gema são proteínas e lipídeos na forma de lipoproteínas ²²⁰. A gema ao ser sedimentada por centrifugação gera uma camada de grânulos e uma camada de plasma (sobrenadante). A camada de grânulos é formada por 70% lipoproteínas de alta densidade (α e β -lipovitelinas), 16% de fosvitina e 12% de proteínas de baixa densidade. A fração de plasma possui 78% das proteínas totais da gema, sendo composta por 86% de lipoproteínas de baixa densidade e 14% de livetinas ¹²⁹. As livetinas são glicoproteínas globulares livres de lipídios, solúveis em água, e que são divididas em três classes: α , β e γ livetinas ¹³⁰. A IgY é a proteína predominante da γ livetinas ^{220, 131}.

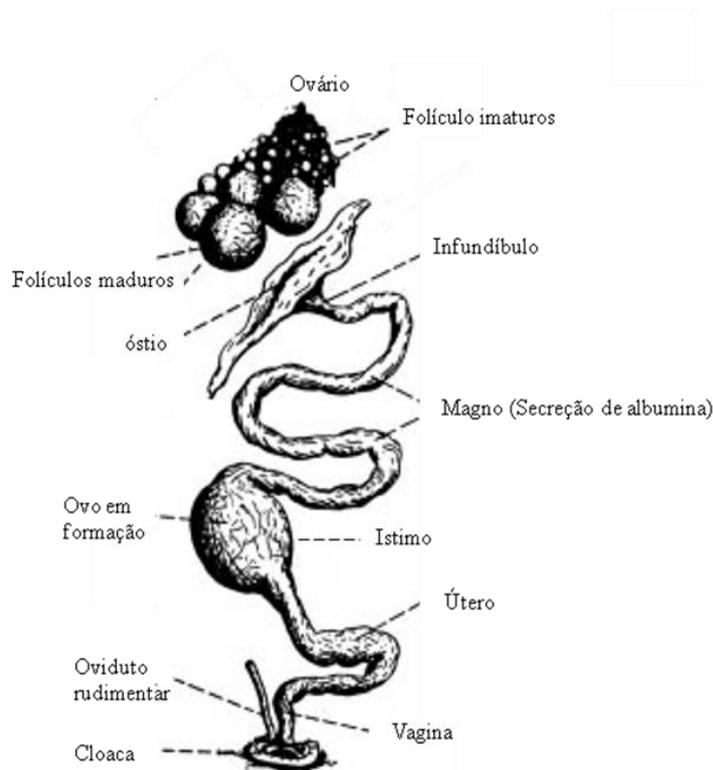


Figura 1.4- Sistema reprodutivo de aves (galinhas) (Modificado de Kovacs-Nolan & Mine ¹²⁸).

1.2.9.2- Métodos de isolamento e purificação de IgY

A separação da IgY requer a remoção de toda a parte lipoprotéica e separação da fração solúvel em água, uma etapa adicional é necessária para separação da IgY (γ livetinas) das outras livetinas (α e β livetinas) e das lipoproteínas de baixa densidade ¹⁰². Apesar de todas as vantagens da utilização da IgY na pesquisa, os métodos de isolamento e purificação na rotina são muitas vezes considerados complicados devido a limitações existentes nesses protocolos ^{132, 133} e principalmente devido a alta concentração de lipídios na gema do ovo ¹⁰². As proteínas A e G comumente empregadas para a purificação de anticorpos policlonais de mamíferos, são incapazes de ligarem-se a IgY devido uma diferença na região Fc deste anticorpo ^{132, 133}.

Em geral os métodos de isolamento e purificação de IgY podem ser divididos em três grupos: de precipitação, cromatográficos e de ultrafiltração ¹³⁴. O método de precipitação envolve a utilização de ácido caprílico ¹³⁵, sulfato de sódio ¹³⁶, sulfato de amônia ^{136, 135}, caragenean ¹³⁷ e polietilenoglicol (PEG) ^{102, 136, 137, 138}. Os métodos cromatográficos podem incluir a cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, de interação hidrofóbica, de interação tiofílica e gel filtração ⁷⁰. A utilização de

solvente orgânico como o clorofórmio não é apropriado, já que este é um agente desnaturante, tornando não aproveitáveis a utilização dos grânulos resultantes da delipidação, além de ser um produto tóxico para o manipulador. Para o isolamento e a purificação da IgY esses métodos podem ser utilizados de forma isolada ou em combinação de acordo com critérios como: quantidade de anticorpo isolado, pureza e atividade biológica ⁶³, escala de produção (laboratorial ou industrial), custo, tecnologia disponível no local e do impacto no ambiente ⁷⁰.

A precipitação utilizando PEG deve ser destacada por ter se tornado a mais utilizada e por se mostrar efetiva na purificação de quantidades consideráveis de anticorpo, utilizando um método de fácil execução e boa reprodutibilidade além do baixo custo ¹³⁴. Envolve dois passos importantes: o primeiro é a remoção de lipídeos e o segundo é a precipitação da IgY do sobrenadante sem lipídeos. A técnica consiste na diluição da gema em tampão fosfato salina e incorporação de duas diferentes concentrações do PEG uma de 3,5% e outra de 12% seguido de sucessivas centrifugações ¹⁰². O grande problema encontrado nesta técnica eram os resíduos do PEG na IgY que acabavam causando problemas em ensaios imunológicos devido ao seu potencial osmótico. Por isso, foi adicionada uma etapa de precipitação com etanol em baixa temperatura, para a remoção dos resíduos presentes ¹³⁸. A pureza obtida gira em torno de 80 a 90%, e o rendimento de IgY por gema fica em torno de 40-80 mg/mL ¹¹⁴.

Atualmente uma grande quantidade de estudos utilizam a cromatografia de afinidade em apoio aos principais métodos de isolamento de IgY ^{139, 140, 141, 142, 143, 116}. A purificação por adsorção tiofílica separa a IgY da matriz que não demonstra propriedades tiofílicas, retirando de 90-95% da matriz protéica ¹⁴⁴. Esse tipo de purificação atualmente é muito utilizada e demonstra ter uma excelente efetividade na retirada de lipídeos não extraídos pela maioria dos processos de isolamento, inclusive o PEG ^{143, 116}. Sua utilização torna-se necessária principalmente quando se quer utilizar a IgY como anticorpo secundário, com a necessidade de conjugação dessa molécula a uma enzima ou fluorocromo, pois os interferentes presentes atuam dificultando o processo de reconhecimento da IgY ao antígeno contra a qual foi produzida, além de interferir diretamente em processos de conjugação com diferentes tipos de enzimas ⁶³.

1.2.10- Aplicações da IgY em Biotecnologia

Anticorpos provenientes de aves podem ser produzidos contra inúmeros tipos de antígenos e aplicados em diferentes métodos para vários propósitos ⁶⁸. Atualmente a maioria das pesquisas envolvendo a tecnologia de IgY abordam duas grandes linhas: a produção de IgY para ser utilizada no imunodiagnóstico e a produção de IgY para utilização na imunização passiva ⁷⁰.

Para o imunodiagnóstico a IgY demonstra ser um excelente imunorreagente devido suas diferentes vantagens frente a IgG de mamíferos explicitadas na tabela 1.1. Além disso, demonstra que pode ser utilizada da mesma maneira que a IgG de mamíferos em testes de imunodiagnóstico ⁶³. Muitas publicações descrevem a IgY como um imunorreagente com sensibilidade e especificidade revelando na comparação com imunoglobulinas de mamíferos, um desempenho igual ou superior ^{63,104,58,112}.

A IgY já foi utilizada como anticorpo primário para detecção de outros anticorpos, peptídeos, hormônios, toxinas, microrganismos, tanto de origem animal quanto de origem vegetal ^{145, 146, 70, 147, 143, 114, 218}. Também demonstrou funcionar de forma adequada como anticorpo secundário, sem danos a sua estrutura ou função, quando as técnicas de conjugação utilizadas para imunoglobulinas de mamíferos foram aplicadas ^{63, 70}. Já foram descritos procedimentos de conjugação da IgY com diferentes enzimas e fluorocromos. Destacam-se a conjugação com biotina ¹⁰¹, fluoresceína ¹⁴⁹, peroxidase de rabanete ¹⁵⁰ e com partículas de ouro coloidal ¹⁵¹. Além disso, a IgY como base em imunoensaios demonstrou ótimos resultados de sensibilidade e especificidade e ausência de reatividade cruzada em diferentes técnicas ^{152, 153, 106; 154}.

Motoi et al. ¹⁵² imunizaram galinhas com duas diferentes proteínas recombinantes de vírus rábico a nucleoproteína (rN) e a fosfoproteína (rP). Para avaliar a capacidade de ligação da IgY ao vírus foram utilizadas as técnicas de *western-blot*, imunofluorescência indireta e imunohistoquímica. Os resultados do *western-blot* demonstraram que a IgY produzida foi capaz de se ligar com especificidade duas proteínas com o peso molecular correspondentes a rN e rP. Na imunohistoquímica, a IgY demonstrou ligação específica aos antígenos virais presentes nos neurônios de ratos infectados, indicando a ligação a rN e rP respectivamente. Na imunofluorescência indireta, a IgY foi capaz de reagir com proteínas virais presentes em monocamadas de células infectadas ¹⁵².

Motoi et al. ¹⁵³ imunizaram galinhas com a proteína recombinante do vírus rábico (rG-F2), obtendo uma IgY anti rG- F2. A IgY foi capaz de detectar sob monocamadas as células infectadas com vírus da raiva na reação de imunofluorescência ¹⁵³. Além disso, a inoculação de anticorpos IgY em camundongos infectados com o vírus foi capaz de reduzir a mortalidade ¹⁵³.

Calzado et al. ¹⁰⁶, purificaram uma IgY anti-IgG de rato com alto grau de pureza, que foi conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para utilização como anticorpo secundário na citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que a razão IgY/FITC foi adequada, sendo obtida uma diluição de trabalho do anticorpo de 1:40, considerada ótima e o conjugado Y foi capaz de reconhecer os antígenos de superfície celular da mesma forma que o conjugado produzido em mamífero testado em comparação ¹⁰⁶.

Lee et al. ¹⁵⁵ produziram uma IgY específica contra uma proteína recombinante (rpIL6) de interleucina 6 de suínos (IL-6). Foi desenvolvido um ELISA de captura para a detecção de IL-6. A IgY foi utilizada como anticorpo de captura de Il-6 em amostras de sangue e uma IgG de camundongo específica a rpIL6 foi também produzida em paralelo e utilizada como anticorpo de detecção. O ELISA de captura foi capaz de detectar cerca de 10 ng/mL de rpIL6, o que demonstrou a excelente especificidade da IgY frente ao antígeno e confirmando seu valor como anticorpo de captura no ELISA ¹⁵⁵.

Kim et al. ¹⁵⁶ produziram em paralelo anticorpos monoclonais (Mab) e IgY contra proteínas de flagelo de *Listeria monocytogenes*, para o desenvolvimento de um ELISA utilizando como anticorpo de captura Mab 2BI e como anticorpos de detecção a IgY (IgY-HRP) e Mab 7A3 (Mab 7A3-HRP) conjugados a peroxidase. O Mab 7A3-HRP, apresentou um limite de detecção de 1×10^6 *L. monocytogenes*/ 0,1 mL enquanto que a IgY-HRP apresentou um limite de detecção de 1×10^5 *L. monocytogenes* / 0,1 mL. A força de detecção da IgY foi dez vezes menor quando comparada ao Mab. Entretanto mesmo tendo a menor capacidade de detecção a IgY provou ser um anticorpo específico para detecção de flagelo de *L. monocytogenes* e a utilização do ELISA Mab- IgY HRP demonstrou ser eficaz para a detecção de *Listeria* spp ¹⁵⁶.

Outra ferramenta da tecnologia de IgY no imunodiagnóstico é a produção de anticorpos monoclonais ⁷⁰, técnica desenvolvida originariamente para mamíferos já é

utilizada com sucesso em células de galinha ⁶⁸. São produzidos contra diferentes antígenos ^{157, 158, 159, 160}, demonstrando ser vantajosa pois combina as propriedades dos anticorpos monoclonais com as vantagens da utilização dos anticorpos provenientes de aves. Demonstra ser o futuro das pesquisas da tecnologia de IgY ⁷⁰. Uma das únicas limitações da utilização da IgY no imunodiagnóstico é a pouca habilidade em precipitar antígenos. Entretanto, foi descrito que essa condição pode ser melhorada utilizando tampões com altas concentrações de cloreto de sódio a 1,5 M com 5% de Polietilenoglicol ⁶³.

Na imunização passiva a IgY pode ser chamada de “alimento funcional” sendo utilizada para o tratamento e profilaxia de diferentes doenças entéricas tanto na medicina humana como na veterinária ⁷⁰, para diversos microrganismos: *Salmonella. sp* ¹⁶¹, *Campylobacter jejuni* ¹⁶², *Escherichia coli* ^{163; 164, 165}, Rotavirus ⁹⁵, Coronavírus ¹⁶⁶, *Helicobacter pylori* ¹⁶⁷, *Streptococcus mutans* ¹⁶⁸. A IgY é resistente à barreira gástrica ⁹⁶. Entretanto, pesquisas relacionadas a utilização de microcápsulas carreadoras para proteção da IgY neste ambiente são descritas ^{96, 169, 220}. A IgY vem sendo ainda empregada no estudo da inibição de xenotransplantes, demonstrando resultados satisfatórios de inibição sem alteração da forma e função celular tanto *in vitro* ¹⁷⁰ como *in vivo* ¹⁷¹. Uma característica muito explorada do sistema imune das aves é a passagem de anticorpos e substâncias para os ovos. Estes são reconhecidamente bons modelos de biorreator, pois diversas substâncias como drogas ou anticorpos recombinantes, podem ser excretadas diretamente na gema ou na clara e utilizadas para o tratamento de diferentes doenças ⁸⁸.

Tabela 1.1: Vantagens da IgY como um imunorreagente (Modificado de Dias da Silva & Tambourgi ¹¹²).

Itens comparativos	IgG produzida em mamíferos	IgY produzida em aves
Reposta imune frente a antígenos de mamíferos Eutanásia	Discreta em função da proximidade filogenética Pode ser necessária	Favorecida pela distância filogenética Não
Fonte de coleta	Sangue	Gemas dos ovos
Tipo de coleta	Invasiva / coleta de sangue eutanásia pode ser necessária	Não invasiva / coleta dos ovos eutanásia não é necessária
Produção de anticorpos	Pouca quantidade 3 g de IgG/ano	Muita quantidade 20 g de IgY/ano

Método de Isolamento e Purificação	Etapas complexas e custosas	Etapas simples e economicamente viáveis
Duração da produção de anticorpos	Duradoura (5 % IgG específica ao antígeno)	Duradoura (1-10% IgY específica ao antígeno)
Ativa complemento / fator reumatóide	Sim	Não
Ligação a receptores Fc celulares	Sim	Não
Ligação com proteína A e G	Sim	Não
Estabilidade	Estável pH 3-10 perde acima de 70°C	Estável pH 4-10 perde acima de 70°C
Avidez	Seletivamente alta	Geralmente alta
Conjugação a enzimas e fluorocromos	Facilmente realizável	Facilmente realizável
Aplicações	<i>Dot Blot, Western-blot, Imunodifusão, Imunoeletroforese, Imunohistoquímica, ELISA, Imunofluorescência, Citometria de Fluxo, Imunocromatografia</i>	<i>Dot Blot, Western-blot, Imunodifusão, Imunoeletroforese, Imunohistoquímica, ELISA, Imunofluorescência, Citometria de Fluxo, Imunocromatografia</i>

1.2.11- Relevância da utilização da IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O perfil epidemiológico da LV no Brasil mudou nos últimos anos, a doença tornou-se urbana. Cada vez é maior o número de casos nas regiões metropolitanas. A doença canina reflete o quadro preocupante da doença no Brasil, já que cães infectados são a principal fonte de infecção para o vetor ^{11, 12; 13}. É cada vez maior o número de áreas novas onde casos caninos são descritos. Recentemente, em junho de 2011 no Rio de Janeiro, foram confirmados 25 casos de LV em cães oriundos do bairro do Caju, região portuária do município. A pesquisa parasitológica realizada confirmou a infecção destes animais por *Leishmania chagasi infantum* e a pesquisa entomológica conduzida no local evidenciou a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis*, classificando assim, o bairro do Caju como o primeiro foco com transmissão de LV canina na área central do município do Rio de Janeiro ¹⁷².

A melhoria nos testes de diagnósticos para a doença tem sido cada vez mais estudada. Muitas são as pesquisas para o aprimoramento da qualidade dos antígenos^{173, 48, 15, 174, 175}, das plataformas diagnósticas, com os testes rápidos^{176, 177}. Entretanto, a melhora da qualidade dos anticorpos secundários não parece ser um interesse da maioria das pesquisas realizadas na área. A elaboração de testes diagnósticos mais sensíveis, específicos, de baixo custo e aplicáveis em larga escala são necessárias.

As imunoglobulinas de mamíferos são as mais utilizadas como anticorpo secundário na maioria dos testes imunodiagnósticos, e com a LVC não é diferente³. Sua utilização envolve questões operacionais como o baixo rendimento, métodos de purificação muitas vezes laboriosos e de maior custo, além de questões éticas devido aos métodos de coleta invasivos, a eutanásia e a manutenção desses animais como doadores de anticorpos⁶³. A utilização de imunoglobulinas proveniente de aves (IgY) neste contexto, torna-se uma alternativa principalmente devido as diferentes vantagens da IgY em relação as IgG de mamíferos, demonstrando um grande valor para a construção de testes mais sensíveis, específicos e de baixo custo.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar o desempenho de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utilizando conjugado enzimático IgY anti-IgG canina produzido em galinhas (*Gallus gallus*).

2.2-Objetivos Específicos

- ❖ Hiperimunizar aves (galinhas poedeiras) com a IgG canina purificada e avaliar os efeitos adversos decorrentes do processo de imunização.
- ❖ Isolar IgY anti-IgG canina da gema de ovos.
- ❖ Purificar a IgY isolada por meio de adsorção tiofílica.
- ❖ Verificar a especificidade da IgY frente ao antígeno imunizante.
- ❖ Conjugar a IgY com a enzima peroxidase e avaliar sua atividade.
- ❖ Desenvolver o ELISA para leishmaniose visceral canina, utilizando a IgY conjugada a peroxidase e avaliar os parâmetros de acurácia do ensaio.
- ❖ Analisar comparativamente o ELISA IgY desenvolvido neste estudo com o ELISA que utiliza IgG anti-IgG canina produzida em mamíferos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

3- Material e Métodos

3.1- Delineamento do estudo

Produção e purificação de imunoglobulina Y proveniente de aves (galinhas poedeiras) hiperimunizadas com IgG canina, avaliação de parâmetros de produção, conjugação à enzima peroxidase, desenvolvimento e verificação da acurácia de um ensaio imunoenzimático (ELISA IgY-HRP) para o diagnóstico da LVC e comparação com o ELISA IgG produzida em mamíferos.

3.2- Obtenção da imunoglobulina Y (IgY) anti-IgG canina de ovos de galinhas imunizadas

3.2.1– Desenho experimental

Foram utilizadas duas galinhas da raça Isa-Brown com idade entre 18-20 semanas. As aves foram selecionadas quanto ao peso médio de 1,8Kg e mantidas individualmente recebendo ração e água potável *ad libitum*. Após a imunização completa, os ovos foram coletados diariamente por um período de 4 meses. Este estudo foi aprovado e teve todos os seus protocolos experimentais revisados pela Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA-Fiocruz. Número da licença: LW-1910 (Anexo 1).

3.2.2– Hiperimunização das aves

Para a imunização das aves, foi utilizada contensão mecânica, num período mínimo de 5 minutos por ave em local apropriado para o manejo, no período da manhã. Foi utilizada 200µg de IgG canina purificada (*Dog gamma globulin fraction ultrapurified* Rockland-Inc) emulsionada em 0,1mg/mL de adjuvante completo de Freund (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Foram realizados ainda, mais dois inóculos nas mesmas condições utilizando adjuvante incompleto de Freund (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). As três inoculações ocorreram com intervalos de 1 semana, por via intramuscular (im., *Musculus pectoralis*, lado direito e esquerdo) na musculatura peitoral com um volume final de 0,5 mL, distribuídos em vários pontos. Após um intervalo de 20 dias do último inóculo, os ovos começaram a ser colhidos diariamente e estocados de 4 a 8°C até o momento do isolamento da IgY.

3.2.3- Isolamento da IgY

O isolamento foi realizado utilizando precipitação por Polietilenoglicol 6000 (PEG-Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) ^{102, 138}. A gema foi diluída 1:5 em PBS (0,018M, pH 7,6), essa solução foi precipitada com 3,5% de PEG, seguido de homogeneização, incubação por 20 minutos e centrifugação a temperatura ambiente (TA) a 5000 x g. O sobrenadante foi submetido a mais duas precipitações com 12% de PEG. Ao precipitado foram adicionados 2,5 mL de PBS a 0°C, e um volume igual de álcool etílico absoluto a 50%, seguido de centrifugação a 10 000 x g por 25 minutos a 5°C negativos. O precipitado foi dissolvido em 2,5 mL de PBS e submetido a congelamento até a utilização.

3.2.4- Determinação da concentração de IgY e avaliação do perfil de produção de IgY anti-IgG canina após a imunização

A concentração de IgY após o isolamento e purificação foi mensurada por espectrofotometria a 280 nm e calculada de acordo com Lambert-Beerlaw utilizando o coeficiente de extinção de 1,33 para IgY ⁶². A fim de analisar o perfil de produção de IgY isolada anti-IgG canina, foram utilizadas as médias da produção de IgY em mg/mL dos animais ao longo de quatro meses após a imunização completa.

3.2.5- Purificação da IgY por adsorção tiofílica

Após o isolamento, a IgY foi submetida a um processo de purificação utilizando adsorção tiofílica em coluna Hitrap IgY purification (GE, Healthcare). A amostra e a coluna foram submetidas a um processo de preparação conforme as instruções do fabricante. Um total de 100 mg de IgY isolada foi aplicada. Solução de ligação (20 mM fosfato de sódio e 0,5M de K₂SO₄, pH 7,5) foi utilizada, para a retirada do material não ligado. A IgY purificada foi obtida utilizando solução de eluição (20 mM fosfato de sódio, pH 7,5). Para a retirada de material não ligado foi utilizada solução de limpeza (20 mM fosfato de sódio, pH 7,5; 30% de isopropanol). As frações (2mL) contendo IgY foram separadas através das maiores leituras de absorbância a 280 nm. A representação gráfica do perfil de purificação foi realizada utilizando as leituras individuais de cada fração.

3.2.6- Caracterização da IgY por SDS-PAGE

Após processo de isolamento e purificação, a IgY foi caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE¹⁷⁸, diluída a 1:4 e aplicada em gel de poliacrilamida com SDS a 10%. A corrida eletroforética foi realizada a 200 V utilizando sistema apropriado (Mini-protean Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc), por 80 minutos. Para visualização, foi utilizada uma solução corante de Comassie Blue (0,4%) por 16 horas a TA em agitação lenta, seguida de descoloração (30% de álcool metílico e 10 % de ácido acético) até a visualização total das bandas protéicas.

3.2.7- Avaliação do perfil de produção de IgY anti-IgG canina específica por ELISA

A fim de analisar o perfil de produção de IgY isolada específica anti-IgG canina, o ELISA foi utilizado nas mesmas condições do item 3.2.8.2 com concentrações fixas ideais de 0,5 µg IgG/mL e 0,8 µg de IgY/mL. Para esta análise, amostras da IgY isolada de todos os ovos colhidos, durante quatro meses após a imunização foram utilizados. A representação gráfica foi realizada utilizando as médias das absorbâncias durante os quatro meses após a imunização.

3.2.8-Verificação da especificidade da IgY frente a IgG canina

3.2.8.1- Imunodifusão radial dupla

A imunodifusão foi realizada segundo protocolo descrito por Ouchterlony¹⁷⁹. Foram testadas duas diferentes soluções: uma contendo agarose (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) 1% diluída em PBS 0,018M e outra contendo agarose a 1% diluída em solução salina a 0,9%. As soluções foram distribuídas sobre lâmina de vidro a uma altura de 0,5 cm. Para adição das amostras, após secagem do gel, foram realizados 6 orifícios com perfurador especial. As amostras de IgY isoladas e de IgG canina purificada foram diluídas respectivamente em PBS e solução salina 0,9% a 1:10, 1:50, 1:100 e 1:200. O gel foi incubado em câmara úmida a 37°C, por 72 horas. Foram realizadas inspeções diárias para observação da linha de precipitação.

3.2.8.2- ELISA

Para analisar a reatividade da IgY frente a IgG canina, placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc) foram cobertas com IgG canina em diferentes concentrações (3,9 a 0,007

µg/mL) em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6), incubadas de 4 a 8°C por 16 horas. Após duas lavagens com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20), foram adicionadas diferentes concentrações de IgY isolada e purificada (56,4 a 0,3 µg/mL) em solução de diluição (PBS 0,05% de Tween 20 contendo 1% de caseína) seguido de incubação 1h a 37°C. Após três lavagens, foi adicionada anti-IgY conjugada a peroxidase produzido em coelhos (Promega Corporation, USA) diluída 1:1000 em solução de diluição, seguidas de incubação por 1h à 37°C. Após nova lavagem, a revelação foi realizada, protegida da luz, com solução reveladora (Na₂HPO₄ 0,83M, ácido cítrico 0,33 M, pH 4,9-5,2, ortofenileno diamina 0,05M, água oxigenada 30 %). Após 30 minutos, a reação foi paralisada com ácido sulfúrico 1M¹⁸⁰. Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Test Line–Biotech Instruments, USA), com filtro de referência de 490nm e diferencial de 630nm.

3.2.8.3- Western blot

IgG canina, de cobaia, de carneiro, de ovelha, de coelho, de equino e de suíno (Rockland-Inc) bem como proteínas de soro de cão clinicamente saudável foram separadas por SDS-PAGE¹⁷⁸. A eletrotransferência foi realizada a 100 V, durante 120 minutos¹⁸¹. As membranas foram incubadas em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 5% de caseína) por 16 h 4°C em agitação lenta. Realizou-se lavagem por 5 minutos, três vezes com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween-20). As membranas foram incubadas com IgY purificada na diluição de 1:250 por 2 horas a 37°C em agitação lenta, seguida de nova lavagem e incubação com anticorpo secundário (anti-chicken IgY [IgG], produzido em coelhos - Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA), na concentração de 1:5000, por 1 hora a 37°C em agitação lenta. As membranas foram lavadas submetidas à incubação com proteína A peroxidase (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) ajustada na concentração de 1:500 por 1 hora a 37°C em agitação lenta. Para revelação foi utilizada solução de revelação (3,3 diaminobenzidina (DAB), peróxido de hidrogênio a 30 %, cloreto de cobalto 1% em PBS), até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com água destilada.

3.3-Produção do conjugado IgY-HRP

3.3.1- Conjugação da IgY purificada com peroxidase de rabanete (HRP)

O processo de conjugação seguiu as recomendações de Nakane & Kawaoi¹⁸². Foi utilizada uma relação de 1 parte do anticorpo a ser conjugado para 1/2 de HRP. A

peroxidase foi diluída em água destilada numa concentração de 7,5 mg/mL e logo após, foi adicionado 375 µL de metaperiodato de sódio (NaIO₄ 0,1 M). Essa solução permaneceu em agitação constante por 20 minutos à temperatura ambiente, sendo submetida logo após a filtração em coluna Sephadex G-25-10 mL (GE-Healthcare) previamente equilibrada conforme instruções do fabricante com tampão acetato de sódio (CH₃COONa 1mM, pH 4,4), um volume inicial de 3,5 mL foi desprezado e 1,7 mL foi coletado. Em seguida, o pH da mistura de peroxidase e metaperiodato foi ajustado para 9,0 com tampão carbonato (Na₂CO₃ 1M, pH 9,0). A IgY purificada (15 mg) foi submetida a filtração em coluna Sephadex G-25 previamente equilibrada com tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃ 0,01M, pH 9,5) um volume inicial de 2,5 mL foi desprezado e 1,5 mL foi coletado. Para a conjugação, o filtrado de IgY e o filtrado de HRP foram agitados lentamente por 2 horas em temperatura ambiente. Após foi adicionada uma solução de borohidrato de sódio (NaBH₄ 0,1 M). A mistura foi incubada por 2 horas a 4°C em repouso e filtrada em coluna Sephadex G-25 equilibrada previamente com PBS, de onde foram desprezados 2,5mL do volume do leito de coluna e coletados 3,0 mL do conjugado final. O conjugado foi estocado a temperatura de -20°C em solução de PBS/Glicerol 70% em uma diluição 1:5.

3.4- Desenvolvimento e avaliação do ELISA utilizando IgY-HRP para o diagnóstico da LVC e comparação com ELISA que utiliza IgG-HRP

3.4.1- Grupo de estudo utilizado

Para a avaliação do ELISA utilizando IgY-HRP, foram utilizadas amostras soros de cães domésticos (*Canis familiaris*) cedidos gentilmente pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Ipec/Fiocruz. Não houve a necessidade de submissão desta parte do trabalho a Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA-Fiocruz por se tratar de amostras de soros provenientes de um estudo previamente aprovado, com licenças de número: P286/06 e L023/06. Os soros selecionados foram divididos em dois grupos:

Grupo I - LVC: amostras provenientes de cães com LV com presença de *L. (L.) infantum chagasi*. As amostras foram coletadas em área endêmica para a doença, na região metropolitana de Belo-Horizonte, Minas Gerais. Na ocasião da coleta, os animais deste grupo foram submetidos a retirada de fragmentos de pele íntegra para a detecção de parasitos por meio de cultura e isolamento, a determinação da espécie deu-se por

eletroforese de isoenzimas¹⁸³. Esses animais foram ainda submetidos a coleta de sangue para realização de testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta (kit IFI-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) e ELISA (kit EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) apresentando resultados positivos.

Grupo II – Controles: amostras provenientes de cães aparentemente saudáveis, sem detecção de *L. (L.) infantum chagasi*. As amostras foram coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, área de transmissão esporádica para a doença humana⁶. Na ocasião da coleta, os animais deste grupo foram submetidos a retirada de fragmentos de pele íntegra para a detecção de parasitos por meio de cultura e isolamento, que determinou a ausência dos mesmos. Esses animais foram ainda submetidos a coleta de sangue para a realização de testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta (kit IFI-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) e ELISA (kit EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) apresentando resultados negativos.

3.4.2- Tamanho da Amostra

Para o estudo de validação, o tamanho da amostra foi calculado considerando uma sensibilidade do ELISA que utiliza conjugado produzido em mamíferos para o diagnóstico da LVC de 94%^{184, 185}. Para o ELISA IgY-HRP foi estimada uma sensibilidade de 96%. Um número mínimo de 408 amostras, 204 soros de cães com LVC e 204 soros de cães controles foram calculados com erro α 5% e um poder de 80%, utilizando-se o calculo amostras para equivalência de duas proporções. Entretanto, foram utilizadas 413 amostras, 204 de cães com LVC e 209 do grupo controle. A repetibilidade foi realizada dentro dos mesmos parâmetros, pelo mesmo observador em duas diferentes observações, utilizando duplicatas.

3.4.3- ELISA para leishmaniose visceral canina utilizando IgY como conjugado enzimático (ELISA IgY-HRP)

3.4.3.1- Obtenção do antígeno para utilização no ELISA

3.4.3.1.1- Crescimento e manutenção *in vitro* da cepa de *L. (L.) infantum chagasi*

A amostra de *L. (L.) infantum chagasi*, (MHOM/BR/1974/PP75) foi mantida através de repiques semanais de culturas de promastigotas em meio bifásico NNN contendo na fase sólida 37g/L de BHI, 2% de ágar e 5% de sangue desfibrinado de

coelho e na fase líquida 5mL de Schneider's (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) suplementado [10% de soro fetal bovino (Nutricell, Brasil), 200 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) e 200 UI/mL de penicilina (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA)]. As culturas foram mantidas em incubadora (BOD-Incubator, FANEM) a temperatura de 28° C.

3.4.3.1.2- Obtenção do extrato bruto total de *L. (L.) infantum chagasi* para o ELISA

Com a finalidade de obtenção de massa parasitária, 5mL de culturas de promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram transferidas para garrafas de cultura de células (Techno Plastic Products - TPP, Suíça) contendo 50 mL de Schneider's suplementado incubados a 28°C por aproximadamente 3 dias. Após esse período as culturas foram quantificadas e repicadas para 300 mL de Schneider's suplementado, mantendo um inoculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL. Após quatro dias de incubação, período inicial da fase estacionária de crescimento ⁴³ os promastigotas foram submetidas a centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos. e lavadas 3 vezes em solução salina estéril (NaCl a 0,9%). A suspensão celular resultante da última lavagem foi ressuspensa em tampão PBS com inibidores de protease contendo 1mM de Iodoacetamida, 1 mM de Fenantrolina e 1 mM de PMSF (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Posteriormente, foi realizada a lise celular constituída por 10 ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento em solução contendo uma parte de gelo seco com uma parte de etanol absoluto (VETEC-Brasil), seguido por um processo de sonicação com somente um ciclo de 45 minutos a 65 Hz. Após, o extrato bruto foi submetido à centrifugação por 14 000 rpm por 10 minutos a 4 °C e submetido à mensuração protéica ¹⁸⁶ e estocagem a -20°C até o uso.

3.4.3.2- Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) utilizando IgY-HRP como conjugado (ELISA IgY-HRP)

O ELISA foi realizado seguindo modificações dos métodos de Voller et al. ¹⁸⁰; Hommel et al. ¹⁸⁷ e Coutinho et al. ¹⁸⁸. Placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc) foram cobertas com 100 µL/poço de extrato bruto de *L. (L.) infantum chagasi* em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) na concentração de 10 µg/ mL, incubadas de 4 a 8°C por 16 horas em câmara úmida. Após três lavagens com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20), foram adicionadas

em volume de 100 µL/poço amostras de soro canino de ambos os grupos de estudo diluídas 1:100 em solução de diluição (PBS 0,05% de Tween 20 contendo 2% de caseína) seguido de incubação por 55 min a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens, a IgY-HRP foi adicionada em volume de 100 µL/poço diluída em solução de diluição na concentração de 1:1500, seguido de incubação por 55 minutos a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem, a revelação foi realizada, protegida da luz, com solução reveladora (TMB-Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Após 30 minutos, a reação foi paralisada com ácido sulfúrico 1M 50 µL/poço. Para as lavagens foi utilizada lavadora de placas automática (Anthos Fluido 96w2 - Instrulab). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Genius, Tecan), com filtro de referência de 450nm e diferencial de 620nm.

3.4.3.2.1- Avaliação e titulação do conjugado IgY-HRP

Para a titulação do conjugado IgY-HRP produzido, foi utilizado o ELISA (descrito no item 3.4.3.2). Como antígeno, extrato bruto de *L.(L.) infantum chagasi* foi utilizado em diferentes concentrações (5 µg, 7,5 µg, 10 µg e 20 µg/mL). Quatro amostras de soro canino dos dois grupos de estudo foram diluídas 1:100 em 1% de caseína (2 soros do grupo 1 e 2 soros do grupo 2). A IgY-HRP, foi testada como conjugado nas seguintes concentrações: 1:1000, 1:1500, 1:2000 e 1:3000. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária (UA= média do soro positivo/ponto de corte do método; ponto de corte= média do soro negativo + 2 x desvio padrão). Foi escolhida como a melhor titulação aquela que apresentou os maiores resultados de UA, baixos valores de leitura no branco e amostras negativas e as altas leituras das amostras positivas.

3.4.4- Teste diagnóstico comparativo para avaliação da qualidade

3.4.4.1- Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) utilizando IgG-HRP como conjugado (ELISA IgG-HRP)

O ELISA foi realizado seguindo modificações dos métodos de Voller et al.¹⁸⁰; Hommel et al.¹⁸⁷ e Coutinho et al.¹⁸⁸. Placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc) foram cobertas com 100 µL/poço de extrato bruto de *L. (L.) infantum chagasi* em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) na concentração de 7,5 µg/mL, incubadas de 4 a 8°C por 16 horas em câmara úmida. Após três lavagens com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20), foram adicionadas

em volume de 100 µL/poço amostras de soro canino de ambos os grupos de estudo diluídas 1:100 em solução de diluição (PBS 0,05% de Tween 20 contendo 1% de caseína) seguido de incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens, a IgG-HRP foi adicionada em volume de 100 µL/poço diluída em solução de diluição na concentração de 1:150 000, seguida de incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem, a reação foi revelada protegida da luz, com solução reveladora (TMB-Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Após 30 minutos, a reação foi paralisada com ácido sulfúrico 1M 50 µL/poço. Para as lavagens foi utilizada lavadora de placas automática (Anthos Fluido 96w2-Instrulab). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Genius, Tecan), com filtro de referência de 450nm e de contraste de 620nm.

3.4.4.2- Avaliação e titulação do conjugado IgG-HRP

Para a titulação do conjugado IgG-HRP produzido foi utilizado o ELISA (descrito no item 3.4.4.1). Como antígeno, extrato bruto de *L.(L.) infantum chagasi* foi utilizado em diferentes concentrações (5 µg, 7,5 µg, 10 µg e 20 µg/mL). Cinco amostras de soro canino dos dois grupos de estudo foram diluídas 1:100 em 1% de caseína (2 soros do grupo 1 e 3 soros do grupo 2). A IgG-HRP, foi testada como conjugado nas seguintes concentrações: 1:100 000, 1:150 000, 1:200 000 e 1:300 000. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária (UA= média do soro positivo/ ponto de corte do método; ponto de corte= média do soro negativo + 2 x desvio padrão). Foi escolhida como a melhor titulação aquela que apresentou os maiores resultados de UA, baixos valores de leitura no branco e amostras negativas e as altas leituras das amostras positivas.

3.5- Análise estatística

Os resultados relativos à obtenção da IgY foram analisados a partir do Biostat 5.0 software¹⁸⁹. Aplicou-se análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis para estabelecer ao longo dos meses após imunização, as diferenças de concentração de IgY isolada e a produção de IgY isolada específica anti-IgG. Inferiu-se o valor de $p < 0,05$.

Os ensaios de ELISA IgY-HRP e ELISA IgG-HRP foram realizados de modo a não desvendar o *status* diagnóstico das amostras, para evitar a ocorrência de viés de classificação. Para a avaliação da acurácia foi utilizado o programa MedCalc versão 11.6.0.0. Na análise, o ponto de corte dos testes e os respectivos intervalos de confiança

foram determinados pela curva ROC, as performances dos dois testes foram comparadas de acordo com a área sobre a curva. O programa utilizado para análise avaliou alguns parâmetros necessários para o controle de qualidade dos testes:

❖Especificidade: Proporção de todos os indivíduos sem a doença que apresentam resultados negativos quando o teste é utilizado. A especificidade é calculada com o número de verdadeiros resultados negativos dividido pelo número de todos os indivíduos sem a doença.

❖Sensibilidade: Proporção de todos os pacientes com a doença que apresentam resultados positivos quando o teste é utilizado. É calculada pelo número de verdadeiros positivos divididos pelo número de todos os pacientes com a doença.

❖Valores preditivos: Definido como a precisão de um teste prever uma doença. Classificado em valor preditivo positivo (número de resultados verdadeiro-positivo dividido pelo número de todos os resultados positivos do teste) e valor preditivo negativo (número de resultados verdadeiro-negativo dividido pelo número de todos os resultados negativos do teste).

❖Curva ROC: Descrição gráfica do desempenho de um teste representado pela relação entre a taxa de verdadeiro-positivos e a taxa de falso-positivos. Representa a precisão intrínseca do teste. A precisão global de um teste pode ser descrita como a área sobre a curva ROC.

❖Eficiência: Relação entre o número de resultados corretos no teste e o total de indivíduos testados (N), isto é, a proporção de diagnósticos corretos.

Para análise da repetibilidade dos testes de ELISA IgY-HRP e ELISA IgG foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for Social Science) versão 16.0 utilizando o coeficiente de correlação intraclassa (ICC), que oferece uma estimativa da variabilidade das medidas devido as variações dos observadores. Valores acima de 0,75 devem ser considerados excelentes, valores acima de 0,4 interpretados como evidência de boa confiabilidade, valor igual a 1 é considerado máximo¹⁹⁰.

A comparação entre as leituras em absorbância das duplicatas dos testes de ELISA IgY-HRP e ELISA IgG-HRP foi realizada no MedCalc versão 11.6.0.0 utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, com intervalo de confiança de 95%, considerando $p < 0,05$ como significativo.

4- Resultados

4.1- Efeitos da imunização na biologia dos animais

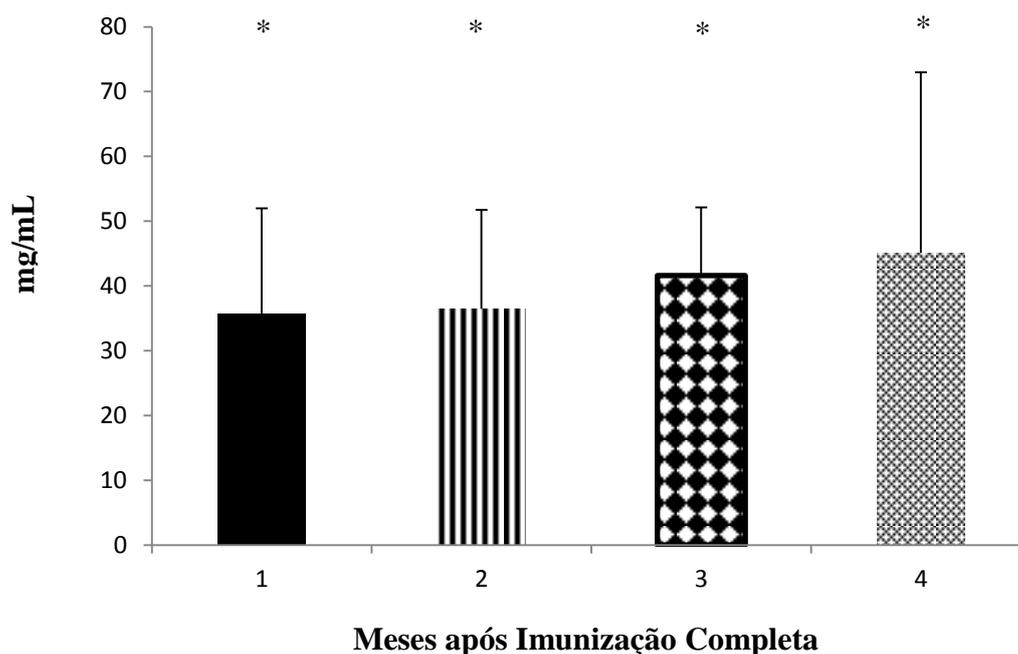
As aves utilizadas permaneceram sadias durante todo o processo de imunização, não apresentando também, nenhuma anormalidade em seu desenvolvimento. Nos locais das injeções não foram detectados dor a palpação, desconfortos ou edemas. Não houve danos teciduais no local das inoculações. O curto tempo de manipulação dos animais durante o processo de inoculação (5 minutos por ave) causaram nos animais baixos níveis de estresse e comportamento calmo durante os procedimentos. Após o procedimento de imunização completo, a postura das aves permaneceu estável por 4 meses, com uma média de 1 ovo por dia por animal.

4.2- Rendimento da produção de IgY

O rendimento da IgY isolada revelou que nas amostras extraídas, as concentrações variaram de 14,28 a 65,48 mg/mL, com média de 39,02 mg/mL. O volume de IgY total extraída de cada ovo foi de 2,5 mL, com uma media de 97,55 mg de IgY /gema. Como o total de IgY total produzida considerada específica ao antígeno inoculado nas aves é de até 10% ^{117,114}, neste trabalho uma média de 9,75 mg de IgY específica seria produzida em uma gema.

Ao analisar a concentração de IgY isolada do precipitado após a imunização completa (Figura 4.1), foi observado um perfil constante durante todos os meses analisados, não sendo demonstrada diferença significativa entre eles (teste de Kruskal-wallis, $H= 2,28$, $p>0,05$). Sem a oscilação da concentração de proteínas durante o período analisado.

Concentração de IgY após Imunização Completa

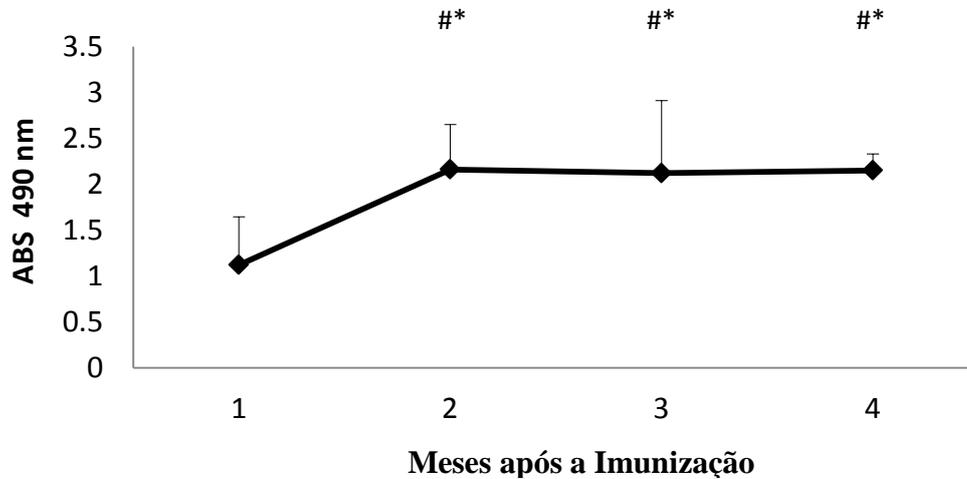


*Sem diferença significativa entre os meses, $p > 0,05$.

Figura 4.1: Concentração de IgY medida por espectrofotometria a 280 nm, após a imunização completa. As barras representam o desvio padrão.

A produção de IgY isolada específica após a imunização é mostrada na figura 4.2, revelando um nível alto da produção de IgY já aos vinte dias após a imunização completa. Houve um aumento significativo de produção de imunoglobulinas do mês 1 para o mês 2 (teste de Kruskal-wallis, $H=17,86$; $p < 0,05$), a partir do qual ocorreu um pico de produção que permaneceu estável até o período final da coleta dos ovos. Não foi demonstrada diferença significativa na produção de IgY nos três últimos meses de coleta de ovos, demonstrando que o nível de anticorpos permaneceu constante, sem apresentar queda de produção durante todo este período (teste de Kruskal-wallis, $H= 17,86$; $p > 0,05$).

Produção de IgY após a Imunização



* Diferente do mês 1, $p < 0,05$.

Sem diferença entre os meses, $p > 0,05$.

Figura 4.2: Produção de IgY isolada anti-IgG canina específica, por ELISA, após a imunização completa. As barras representam o desvio padrão.

4.3- Perfil da IgY por SDS PAGE

O SDS-PAGE da IgY anti-IgG canina em condições de redução é mostrado na figura 4.3A, a linha 1 revela a IgY isolada por PEG. Podem ser visualizadas diversas bandas de diferentes pesos moleculares, que variaram de 220 a 25 kDa. A cadeia pesada da IgY apresentou 68 kDa, enquanto a cadeia leve 27 kDa. As bandas proteicas acessórias visualizadas representam impurezas que não foram totalmente eliminadas no processo de purificação. Vale ressaltar que o perfil eletroforético da IgY demonstra uma pequena quantidade de bandas acessórias presentes o que caracteriza o bom resultado do processo de purificação obtido pelo uso da precipitação por polietilenoglicol.

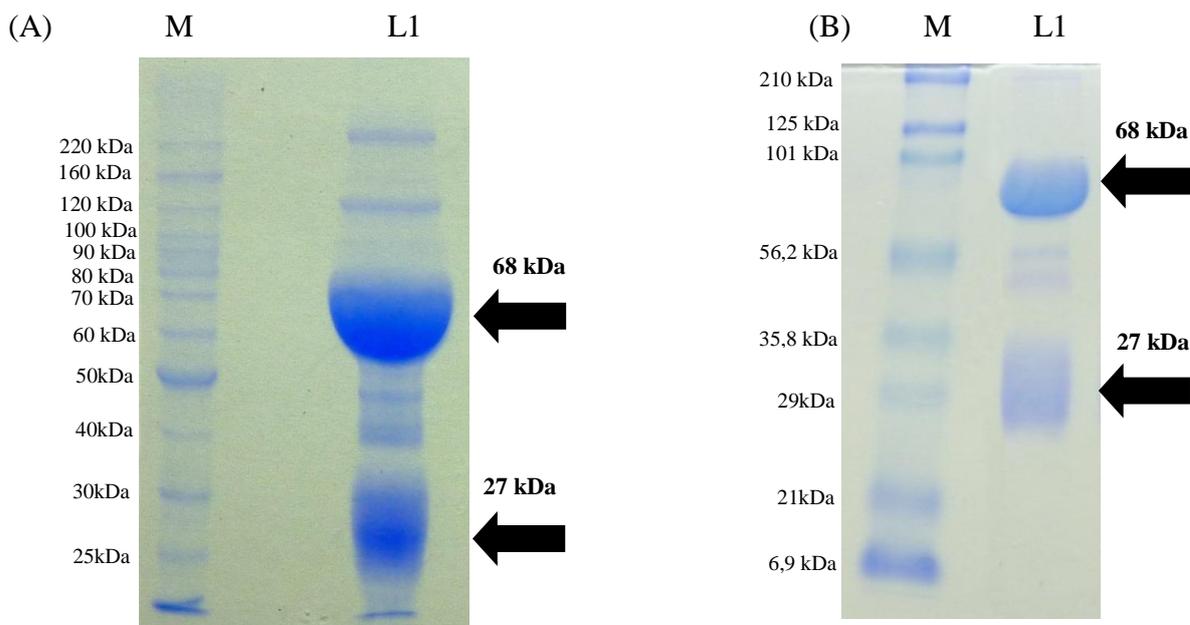


Figura 4.3- Análise por SDS-PAGE em condições de redução da IgY anti-IgG canina, após isolamento por PEG (A) e purificação por adsorção tiofílica (B). Figura 4.3 A: Linhas: (M) – padrão de peso molecular; (1) – IgY isolada por PEG. Figura 4.3 B: Linhas: (M) – padrão de peso molecular; (1) – IgY purificada por adsorção tiofílica.

A presença de bandas acessórias mesmo que em pequena quantidade justificou um posterior processo de purificação, realizado por meio de adsorção tiofílica. A figura 4.4 mostra o perfil de purificação. As frações contendo a IgY após esse processo, foram obtidas do tubo 27 ao tubo 29, onde ocorreram as maiores leituras e conseqüentemente o pico de saída da amostra. Foi coletado um total de 6 mL de IgY purificada. As amostras foram reunidas e mensuradas resultando uma concentração final de 5,6 mg/mL, obtendo-se em cada extração 34 mg de IgY purificada.

Perfil da purificação da IgY por Adsorção Tiofílica

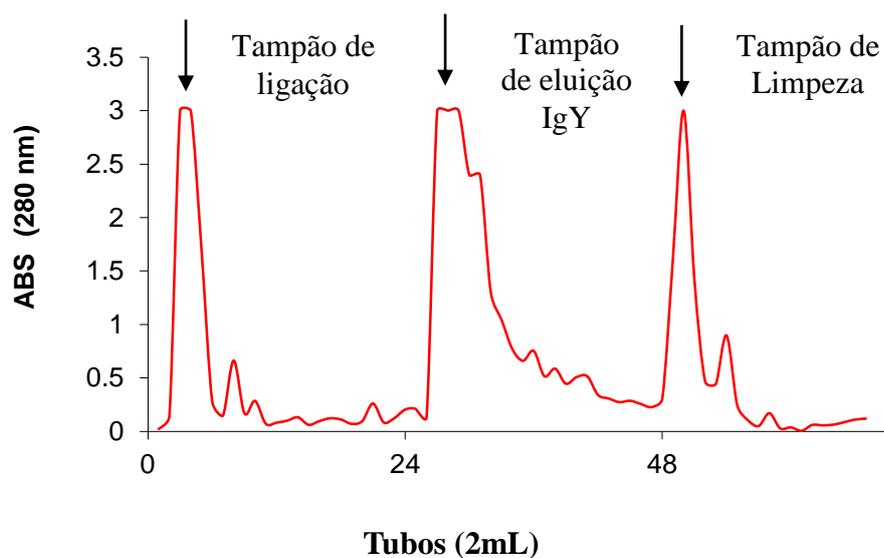


Figura 4.4: Perfil do processo de purificação da IgY utilizando adsorção tiofílica.

O SDS-PAGE da IgY purificada em condições de redução é mostrado na figura 4.3B, a linha 1 revela a IgY purificada, demonstrando um perfil semelhante ao apresentado anteriormente, a cadeia pesada da IgY apresentando 68 kDa, enquanto a cadeia leve 27 kDa. A diminuição de bandas acessórias pôde ser visualizada. Entretanto, foi verificada a presença de bandas entre 56,2 e 35,8 kDa ainda não eliminadas mesmo após o processo de purificação.

4.4- Verificação da especificidade da IgY frente a IgG canina

4.4.1- Imunodifusão Radial dupla

Não foi detectada a presença de linha de precipitação durante as 72 horas em que o gel foi analisado, em nenhum dos protocolos utilizados.

4.4.2- ELISA

De forma similar, tanto a IgY anti-IgG canina isolada como a purificada demonstraram reatividade frente ao antígeno imunizante até a diluição de 1:51200 (0,08µg de IgY), utilizando uma diluição de 1:40959 (0,05 µg) de IgG canina. Revelando uma excelente especificidade da IgY produzida frente ao antígeno imunizante, sem a ocorrência de prejuízos nem mesmo após o processo de purificação.

4.4.3- *Western-blot*

No *western blot* (Figura 4.5), a linha 1 demonstra que a IgY purificada foi capaz de reconhecer de maneira específica a IgG canina purificada. Foram visualizadas bandas de 216 kDa a 7,6 kDa, reconhecendo ainda com forte intensidade tanto a cadeia pesada (55 kDa) quanto a cadeia leve (22 kDa) da IgG canina²⁰⁴. De modo semelhante, este anticorpo reconheceu também IgG de soro de cão clinicamente saudável (linha 2). A IgY não foi capaz de reconhecer IgG de outras espécies animais como a IgG de cabra (linha 3), IgG de cavalo (linha 4), IgG de suíno (linha 5), IgG de carneiro (linha 6), IgG de coelho (linha 7) e IgG de cobaia (linha 8). O que demonstra a forte sensibilidade e especificidade da IgY produzida frente a IgG canina purificada e a presente no soro além da ausência de reações cruzadas.

Os resultados encontrados com a produção da IgY, isolamento, purificação e verificação da especificidade foram publicados como resumos nos anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2011 (Anexo 2). Foram ainda submetidos para publicação no periódico *Veterinary Immunology and Immunopathology*. O manuscrito foi analisado e no momento está em fase de correção, solicitada pelo periódico para posterior publicação (Anexo 2).

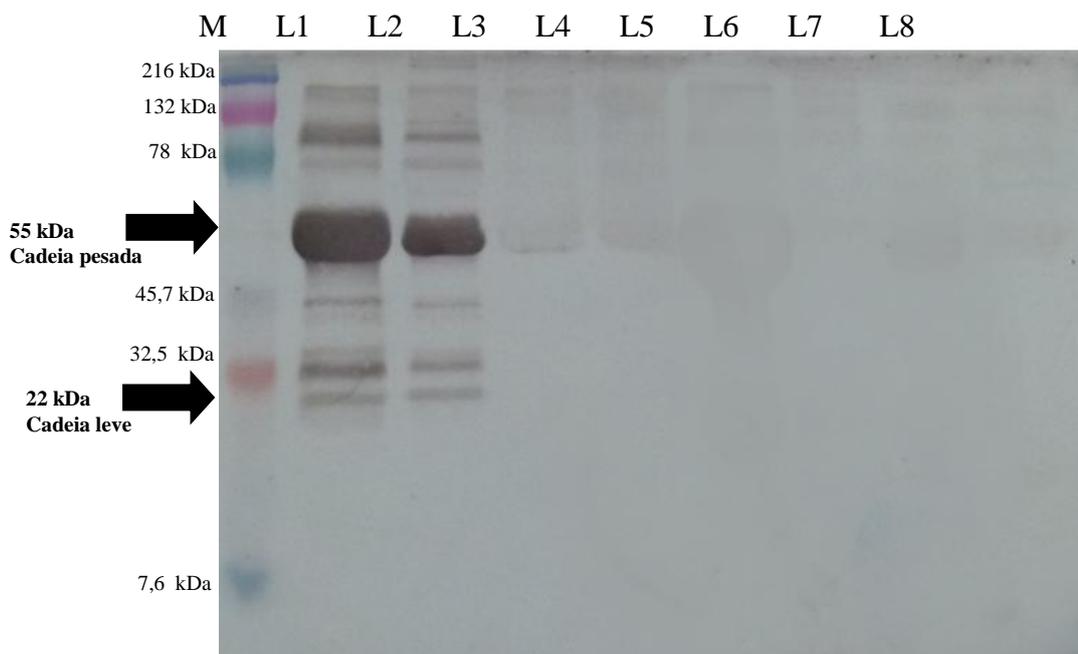


Figura 4.5: Análise por *western-Blot* da reatividade IgY purificada anti-IgG canina com IgG purificada de diferentes espécies e soro de cão clinicamente saudável. Linhas:(M)-padrão de peso molecular. (1)- IgG de cão; (2) – soro de cão clinicamente saudável; (3) – IgG de cabra; (4) –IgG de cavalo; (5) –IgG de suíno; (6)–IgG de carneiro; (7) –IgG de coelho; (8)–IgG de cobaia.

4.5- ELISA para leishmaniose visceral canina utilizando IgY como conjugado enzimático

4.5.1- Avaliação e titulação do conjugado IgY-HRP e IgG-HRP

Os resultados da titulação utilizando a IgY-HRP demonstraram capacidade de discriminação das amostras positivas e negativas para LVC até a diluição de 1:3000, diante de todas as concentrações de antígeno testadas (tabela 4.1), mostrando que a conjugação não alterou sua estrutura e capacidade de ligação diante da IgG canina disponível.

Neste mesmo ensaio a titulação de trabalho (tabela 4.1) ideal foi avaliada. Foram encontradas medidas de UA altas em todas as diluições testadas. Utilizando a diluição de 1:1000 foram encontradas medidas de UA mais elevadas com 7,5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL de antígeno, na diluição de 1:1500 com 10 µg/mL de antígeno, na diluição de 1:2000 com 7,5µg/mL e 10 µg/mL de antígeno e na diluição de 1:3000 com 7,5 µg/mL e 10 µg/mL de antígeno. A diluição de trabalho mais adequada foi a de 1:1500 utilizando 10 µg/mL de antígeno, levando em consideração as altas medidas de UA,

leituras do branco baixas e dentro do esperado, as altas leituras das amostras positivas, as baixas leituras das amostras negativas e a discriminação entre elas. As outras diluições, mesmo apresentando valores de UA altas não foram utilizadas por apresentarem leituras de branco altas ou leituras baixas das amostras positivas.

Durante a realização dos primeiros ensaios com as condições ideais definidas na titulação para o conjugado IgY-HRP, foi notada a presença de cor de fundo em alguns dos testes (leituras elevadas do branco), utilizando 1% de caseína como proteína bloqueadora. Foi constatado que essas leituras mais altas poderiam atrapalhar a interpretação. Mesmo que essa condição não tenha sido verificada para a maioria dos ensaios realizados, foi necessário para resolver esse problema, o aumento da concentração de caseína para 2%.

Tabela 4.1- Resultados da avaliação e titulação da IgY-HRP. Representação da UA, das leituras em Abs das amostras e do branco frente as respectivas concentrações de antígeno e diluições da IgY-HRP testadas.

Diluições de IgY-HRP						
[Antígeno]	1000					
	Branco	Negativos	Positivo 1	UA 1	Positivo 2	UA 2
5 µg/mL	0,215	0,259	1,634	5,320	1,013	3,298
7,5 µg/mL	0,180	0,171	1,836	7,738	1,718	7,240
10 µg/mL	0,166	0,147	1,399	9,210	1,999	13,157
20 µg/mL	0,173	0,133	0,990	6,073	1,745	10,696
1500						
5 µg/mL	0,157	0,264	0,804	2,141	1,201	3,196
7,5 µg/mL	0,102	0,161	0,958	3,845	1,253	5,028
10 µg/mL	0,052	0,117	0,800	6,564	1,338	10,982
20 µg/mL	0,037	0,100	0,552	4,315	0,911	7,126
2000						
5 µg/mL	0,085	0,093	0,446	2,745	0,794	4,611
7,5 µg/mL	0,119	0,070	0,606	7,546	0,814	10,132
10 µg/mL	0,097	0,083	0,687	6,858	1,053	10,519
20 µg/mL	0,089	0,148	0,445	2,375	0,832	4,444
3000						
5 µg/mL	0,020	0,066	0,378	4,671	0,558	6,883
7,5 µg/mL	0,025	0,060	0,526	8,430	0,648	10,384
10 µg/mL	0,027	0,063	0,450	6,397	0,726	10,311
20 µg/mL	0,099	0,098	0,313	2,998	0,579	5,536

A diluição de trabalho para o conjugado IgG-HRP também foi analisada (tabela 4.2). Foi escolhida como a melhor diluição de trabalho a de 1: 150 000 utilizando 7,5 µg/mL de antígeno, levando em consideração as medidas mais altas de UA, as leituras

adequadas das amostras positivas, as mais condizentes com as leituras reais dos soros utilizados, as baixas leituras das amostras negativas e as baixas leituras do branco. O conjugado IgG-HRP foi capaz de discriminar as amostras negativas e positivas em todas as diluições e concentrações utilizadas, demonstrando ainda leituras altas nas amostras positivas, baixas nas amostras negativas, além de não apresentar cor de fundo na maioria das diluições e concentrações trabalhadas. A diluição de trabalho escolhida para o conjugado IgG-HRP foi mil vezes mais diluída, quando comparada ao conjugado IgY-HRP.

Tabela 4.2- Resultados da avaliação e titulação da IgG-HRP. Representação da UA, das leituras em Abs das amostras e do branco frente as respectivas concentrações de antígeno e diluições da IgG-HRP testadas.

Diluições de IgG- HRP						
[Antígeno]	100 000					
	Branco	Negativos	Positivo 1	UA 1	Positivo	
					2	UA 2
5 µg/mL	0,012	0,074	0,542	4,046	0,444	3,314
7,5 µg/mL	0,014	0,12	1,059	4,227	0,984	3,930
10 µg/mL	0,015	0,083	1,206	6,014	1,547	7,714
20 µg/mL	0,01	0,068	1,258	10,745	1,236	10,557
	150 000					
5 µg/mL	0,012	0,058	0,327	2,970	0,361	3,281
7,5 µg/mL	0,012	0,054	0,763	5,293	0,750	5,204
10 µg/mL	0,011	0,203	1,015	2,526	1,447	3,602
20 µg/mL	0,019	0,095	1,492	14,482	1,332	12,931
	200 000					
5 µg/mL	0,013	0,05	0,432	2,949	0,281	1,921
7,5 µg/mL	0,012	0,048	0,281	2,015	0,115	0,824
10 µg/mL	0,023	0,08	0,555	2,800	0,205	1,036
20 µg/mL	0,012	0,115	0,918	4,428	0,814	3,928
	300 000					
5 µg/mL	0,011	0,036	0,463	3,629	0,298	2,333
7,5 µg/mL	0,049	0,045	0,569	4,865	0,427	3,655
10 µg/mL	0,132	0,09	0,638	0,877	0,622	0,854
20 µg/mL	0,01	0,138	0,664	1,493	0,590	1,328

4.5.2- Avaliação dos parâmetros de acurácia do ELISA utilizando IgY-HRP como conjugado para LVC.

Foi verificado que o melhor valor de ponto de corte indicado pela análise da curva ROC para o teste foi de $> 0,156$ (tabela 4.3). Utilizando este valor, não foram obtidas amostras falso positivas ou falso negativas, 204 amostras verdadeiro positivas e

209 verdadeiro negativas. O valor da especificidade e da sensibilidade do teste foi de 100%. O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 100%, a área sob a curva foi 1. A eficiência do ensaio calculada apresentou um valor de 100%.

Tabela 4.3: Parâmetros de acurácia do ELISA para LVC utilizando IgY-HRP como conjugado.

Parâmetros de Acurácia	ELISA IgY-HRP (IC 95%)
Ponto de corte	>0,156
Especificidade	100% (98,3 - 100,0)
Sensibilidade	100% (98,2 - 100,0)
VPP	100%
VPN	100%
Eficiência	100%
Área sob a curva	1

4.5.3- Avaliação dos parâmetros de acurácia do ELISA utilizando IgG-HRP como conjugado para LVC

O melhor valor de ponto de corte indicado pela análise da curva ROC para o teste foi de > 0,338 (tabela 4.4). Utilizando este valor, não foram obtidas amostras falso positivas ou falso negativas, 204 amostras verdadeiro positivas e 209 verdadeiro negativas. O valor da especificidade e da sensibilidade do teste foi de 100%. O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 100%, a área sob a curva foi 1. A eficiência do ensaio calculada apresentou um valor de 100%.

Tabela 4.4: Parâmetros de acurácia do ELISA para LVC utilizando IgG-HRP como conjugado.

Parâmetros de Acurácia	ELISA IgG-HRP (IC 95%)
Ponto de corte	>0,338
Especificidade	100% (98,3 - 100,0)
Sensibilidade	100% (98,2 - 100,0)
VPP	100%
VPN	100%
Eficiência	100%
Área sob a curva	1

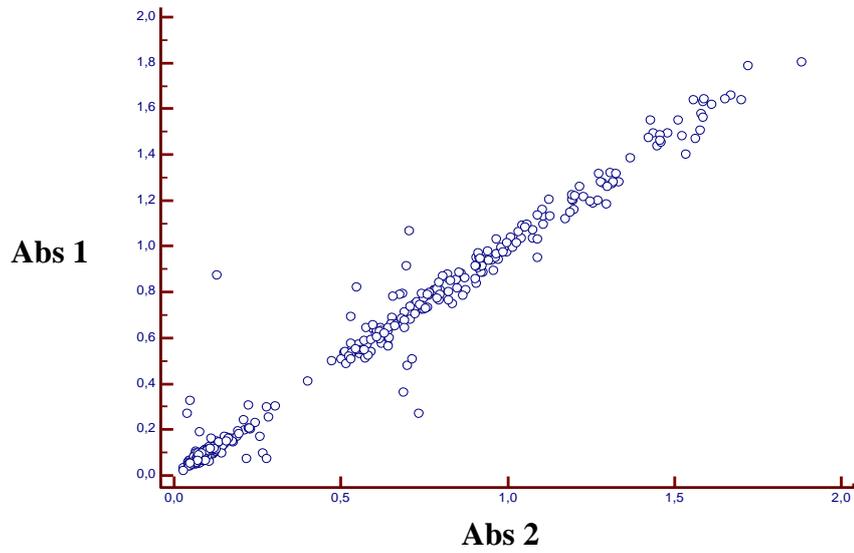
4.5.4- Correlação entre as duplicatas do ELISA IgG-HRP e ELISA IgY-HRP nas duas observações realizadas

Os resultados dos coeficientes de correlação estão expressos na tabela 4.5. Os dois ensaios analisados demonstraram coeficientes de correlação excelentes, revelando a proximidade dos valores de absorvâncias das duplicatas nas duas observações. Tanto no ELISA IgY-HRP quanto no ELISA IgG-HRP, o primeiro ensaio demonstrou um menor agrupamento das duplicatas quando comparado com o segundo ensaio (figura 4.6 e 4.7), entretanto pôde ser observado um agrupamento maior das amostras do ELISA IgY-HRP tanto na primeira quanto na segunda observação, quanto comparadas as duas realizadas para o ELISA IgG-HRP. Tal resultado revelou a maior concordância dos valores das duplicatas das leituras nas duas observações realizadas por ELISA IgY-HRP (figura 4.6).

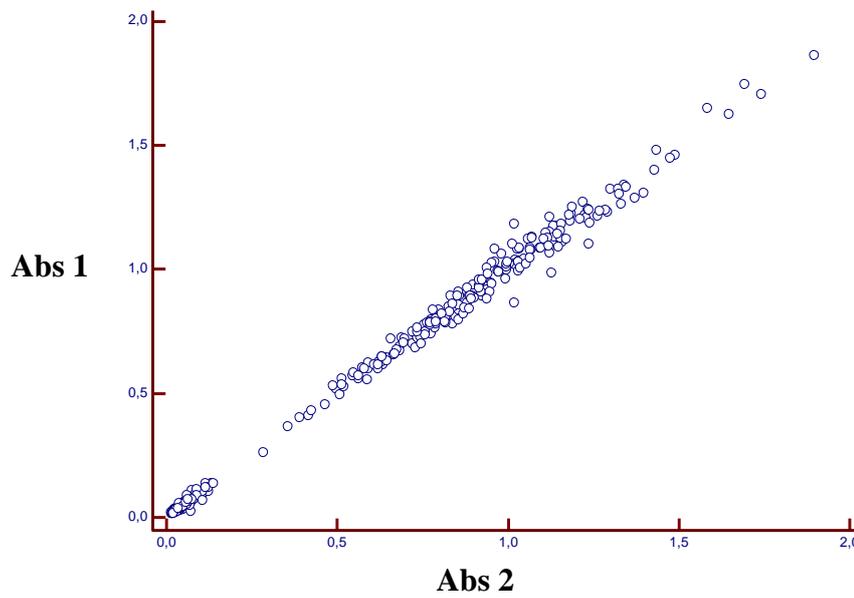
Tabela 4.5- Coeficiente de correlação através do teste de Pearson entre as leituras em absorvância das duplicatas do ELISA IgY-HRP e ELISA IgG-HRP nas duas observações realizadas.

	ELISA IgY-HRP		ELISA IgG-HRP	
	Observação 1	Observação 2	Observação 1	Observação 2
Coefficiente de correlação	0,9897	0,9982	0,9775	0,9931
IC 95%	98,75 - 99,15	99,79 - 99,85	97,27 - 98,14	99,17 - 99,43
valor de p	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

Primeira observação do ELISA IgY-HRP



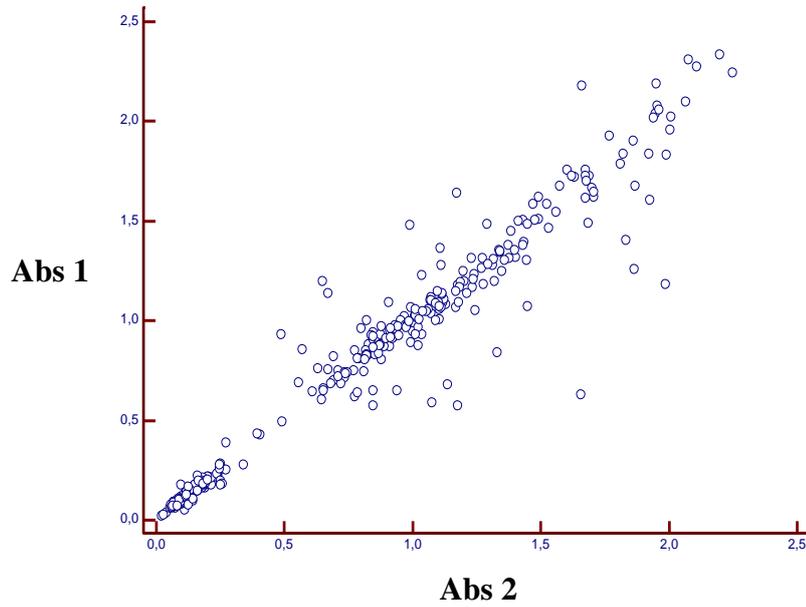
Segunda observação do ELISA IgY-HRP



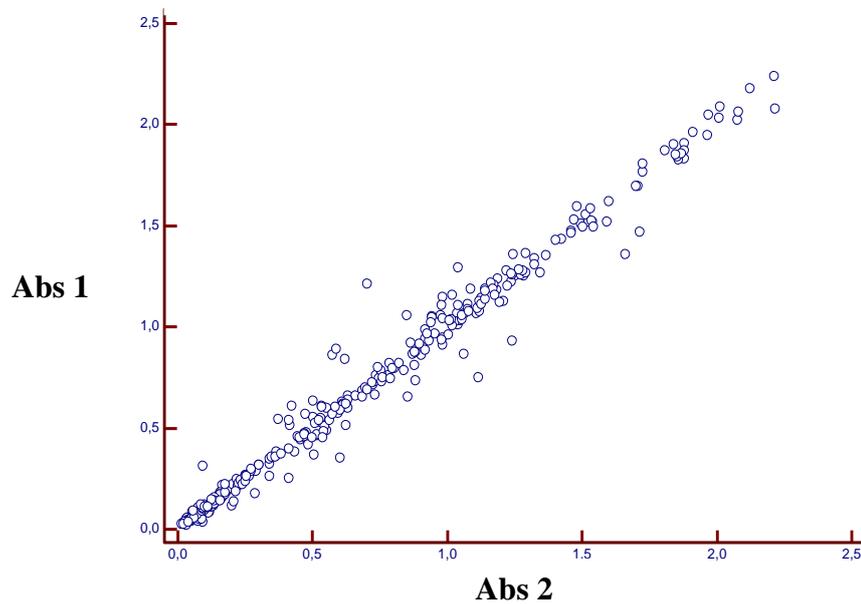
Abs 1- Primeira leitura do ensaio em Abs // Abs 2- Segunda leitura do ensaio em Abs

Figura 4.6- Correlação entre as leituras das duplicatas (Abs 1 e Abs 2) nas duas observações realizadas para o ELISA-IgY-HRP.

Primeira observação do ELISA IgG-HRP



Segunda observação do ELISA IgG-HRP

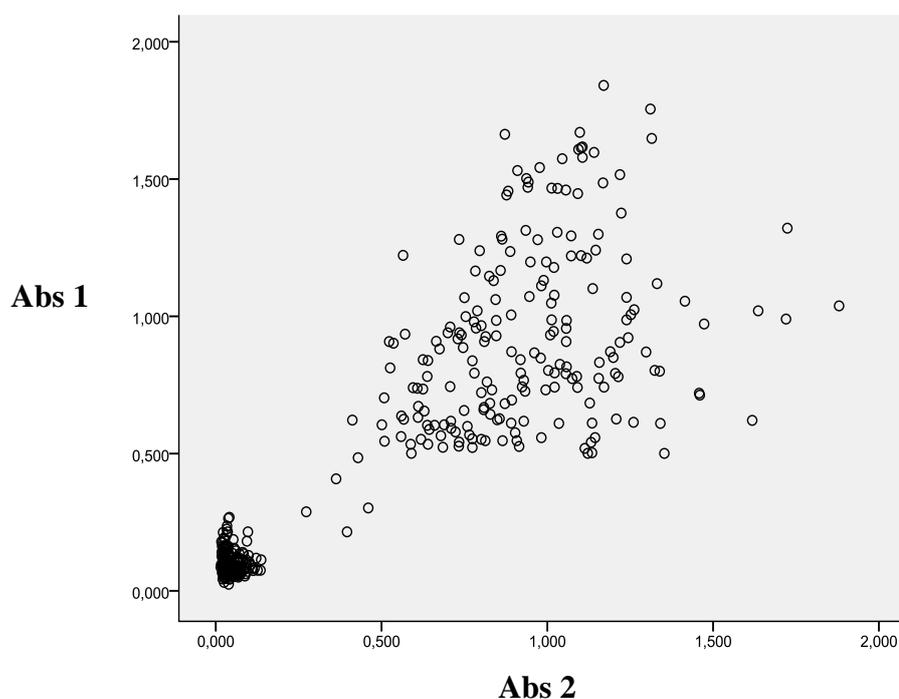


Abs 1- Primeira leitura do ensaio em Abs 1 // Abs 2- Segunda leitura do ensaio em Abs

Figura 4.7- Correlação entre as leituras das duplicatas (Abs 1 e Abs 2) nas duas observações realizadas para o ELISA-IgG-HRP.

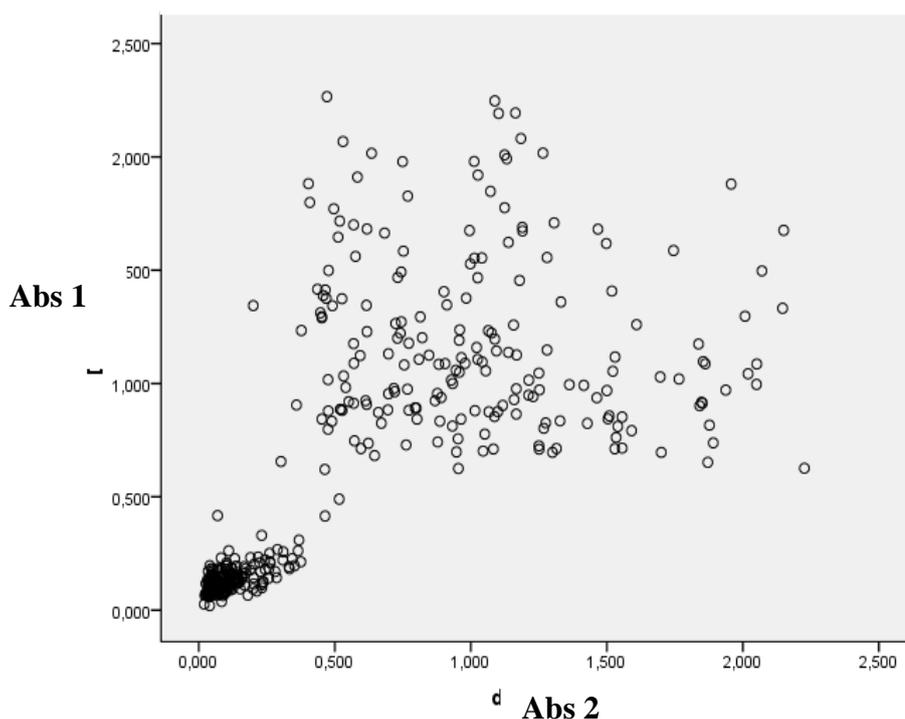
4.5.5- Análise da repetibilidade do ELISA-IgG-HRP e ELISA IgY-HRP

O estudo de repetibilidade revelou valores de coeficiente de correlação interclasse (ICC) muito adequados para os dois testes realizados. Para o ELISA IgY-HRP foi de 0,928 (IC 95% - 91,3-94,1) e para o ELISA IgG-HRP de 0,822 (IC 95% - 78,4-85,4). O valor de ICC para o ELISA IgG-HRP foi estatisticamente menor quando comparado ao do ELISA IgY-HRP ($p < 0,0001$), demonstrando uma melhor repetibilidade quando utilizou-se a IgY-HRP. As figuras 4.8 e 4.9 demonstram que a distribuição das amostras durante as duas observações foi mais homogênea quando a IgY-HRP foi utilizada, revelando um maior agrupamento das amostras negativas e positivas quando comparado com as duas observações do ELISA IgG-HRP em que o agrupamento das amostra negativas e positivas foi menor.



Abs 1- Primeira observação do ensaio // Abs 2- Segunda observação do ensaio

Figura 4.8-Gráfico da análise de repetibilidade do ELISA IgY-HRP.



Abs 1- Primeira observação do ensaio // Abs 2- Segunda observação ensaio

Figura 4.9- Gráfico da análise de repetibilidade do ELISA IgG-HRP.

4.5.6- Comparação dos parâmetros de acurácia para o ELISA IgY-HRP e o ELISA IgG-HRP

Os valores de acurácia para o ELISA utilizando IgY-HRP e IgG-HRP foram máximos e idênticos, conseqüentemente na análise da área sob a curva, houve uma sobreposição (Figura 4.10). A curva ROC determinou para o ELISA IgY-HRP o ponto de corte de $>0,156$ menor, quando comparado ao do ELISA IgG que foi de $>0,338$. As figuras 4.11 e 4.12 demonstram a distribuição das médias das absorbâncias nas duas observações do ELISA com IgY-HRP e do ELISA com IgG-HRP realizados, onde pôde ser verificado novamente, um maior agrupamento tanto das amostras negativas como das amostras positivas quando a IgY-HRP foi utilizada.

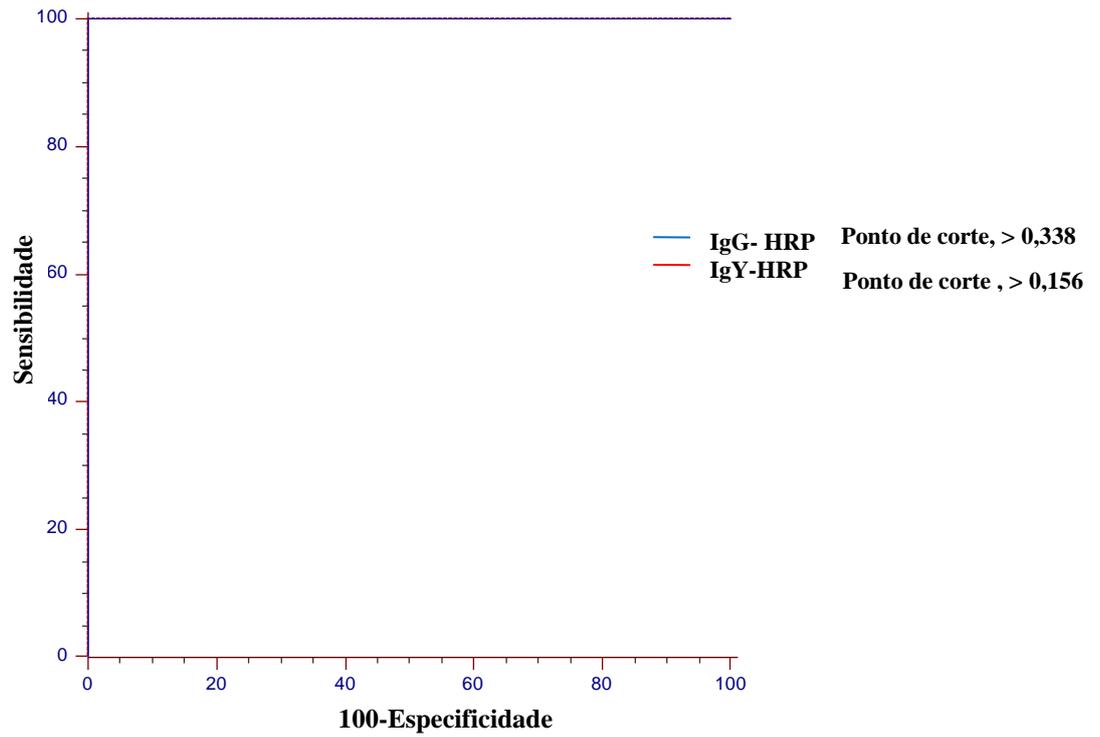


Figura 4.10- Curva ROC do ELISA IgY-HRP e do ELISA IgG-HRP.

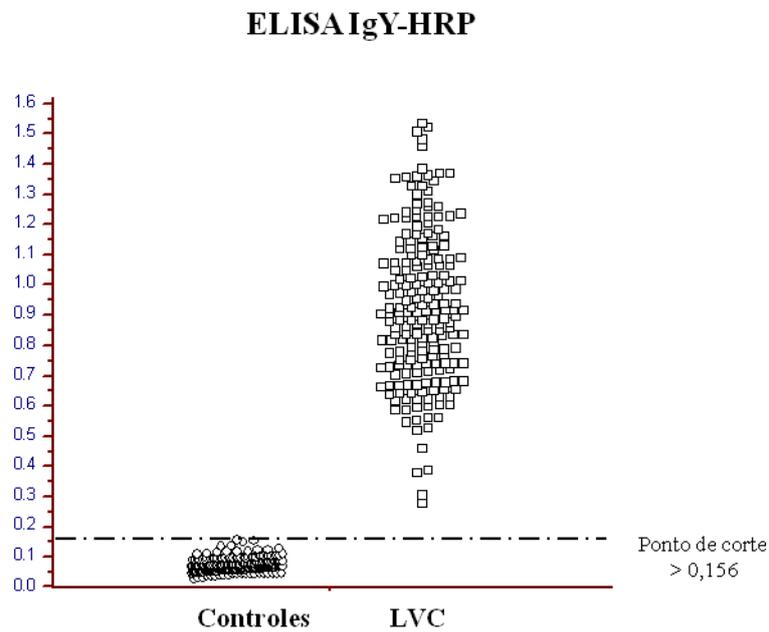


Figura 4.11- Distribuição dos valores das médias das absorbâncias nas duas observações realizadas para o ELISA IgY-HRP.

ELISA IgG-HRP

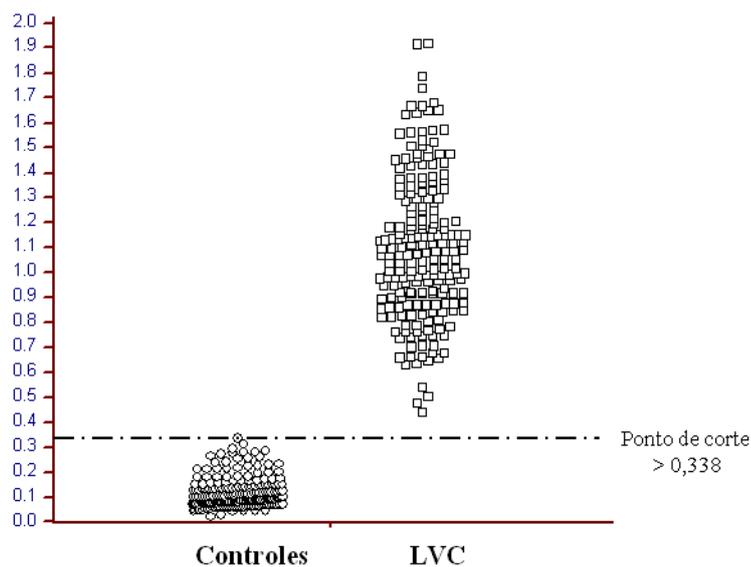


Figura 4.12- Distribuição dos valores das médias das absorbâncias nas duas observações realizadas para o ELISA IgG-HRP.

Os resultados encontrados com a produção do ELISA IgY-HRP, foram publicados como resumo nos anais da XXVII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2011(Anexo 3). E o manuscrito está sendo preparado para a publicação.

5- Discussão

A produção de anticorpos contra IgG canina é muito importante para a montagem de kits diagnósticos que se destinam a detecção de marcadores sorológicos de infecção, principalmente quando se considera uma zoonose como a LVC em que o cão está envolvido como principal reservatório doméstico ⁷. As principais imunoglobulinas utilizadas como imunorreagentes são os anticorpos policlonais provenientes de mamíferos que, apesar do uso corrente, tem sua produção limitada pelo rendimento, presença de impurezas, reações cruzadas, além dos aspectos éticos relacionados aos métodos de coleta invasivos e a eutanásia. O que se deseja em relação a produção de anticorpos é que esta seja realizada de forma a causar o menor estresse possível nos animais envolvidos, combinado a uma grande produção de anticorpos, por longos períodos e um processo de purificação simples, eficaz e economicamente viável. A produção de anticorpos em aves atende todas essas necessidades ¹⁹¹.

A busca por recursos alternativos, à utilização de animais está cada vez mais difundida entre a comunidade científica. A utilização de aves é uma alternativa ética para produção de anticorpos, além de ser mais econômica, pois a extração de IgY das gemas dos ovos das galinhas imunizadas proporciona a obtenção de anticorpos em grande quantidade e por longos períodos. A IgY é uma excelente ferramenta no imunodiagnóstico por apresentar características que conferem vantagens quando comparadas a IgG de mamíferos: a IgY não se liga a receptores Fc de células de mamíferos, e não ativa o complemento ⁶⁴, não se liga a proteína A de estafilococos e demonstra pouca reatividade cruzada com a IgG de mamíferos ¹⁰⁸, apresentando ainda alta avidéz e afinidade ¹⁰⁴.

A IgY já foi produzida contra imunoglobulinas de diferentes espécies animais, mostrando excelente desempenho em comparação a imunoglobulinas de mamíferos ⁶⁷; ¹⁹², ¹⁹³. Também é utilizada com sucesso na imunização passiva de cães contra parvovirus ¹⁹⁴. Griot-Wenk et al. ¹⁹⁵, utilizando proteínas recombinantes derivadas da cadeia pesada de IgE canina, produziram IgY capaz de reconhecer com efetividade IgE canina. Diante dos relatos de sucesso da utilização da IgY em cães como modelo, tanto no imunodiagnóstico, quanto na imunização e da ausência de trabalhos científicos em torno da pesquisa e utilização da IgY contra IgG canina para imunodiagnóstico, tornou-se necessário e justificável um estudo mais aprofundado relacionado a produção e desempenho frente ao antígeno imunizante. Por isso, neste trabalho foi descrita a

produção de um novo anticorpo policlonal produzido em gema de ovos de galinha capaz de reconhecer com efetividade a IgG canina, além de funcionar como conjugado enzimático de maior efetividade, no ELISA para LVC, quando comparado ao produzido em mamíferos. Tais resultados demonstraram que a IgY é uma alternativa efetiva, quando comparada aos anticorpos produzidos em mamíferos, conforme a descrição de outros autores^{63,104,58,112}.

Ao avaliar o protocolo de imunização, não foram detectados mortes ou efeitos adversos decorrentes do imunógeno utilizado nem durante ou após a imunização completa. O comportamento dos animais foi de acordo com o habitual da espécie. Uma das justificativas deste fato se deve ao curto período de tempo manipulando os animais, somente 5 minutos por ave durante a imunização. Além disso, a utilização do ACF, responsável diretamente pela grande maioria das lesões musculares granulomatosas na região das inoculações¹⁹⁶, somente na primeira dose, sendo substituído pelo AIC, causador de menos efeitos adversos, nas doses subsequentes. A ausência de efeitos adversos decorrentes da imunização é descrita em muitos trabalhos que utilizam galinhas como doadoras de anticorpos, utilizando diferentes tipos de antígenos imunizantes^{124 191, 125}, ao contrário disto, comumente são descritas lesões e efeitos adversos decorrentes do processo de imunização em mamíferos¹¹⁹. Entretanto em aves são descritos protocolos vacinais utilizando somente como adjuvante o ACF, sem que sejam detectadas lesões teciduais locais⁹⁵. Na produção de anticorpos em aves não há a necessidade da utilização de métodos invasivos de coleta, o que diminui a ocorrência do estresse e efeitos colaterais causados pela anestesia ou pelo próprio procedimento, consequentemente, não afetando a produção de IgY.

Não houve queda da postura durante ou após a imunização, esta permaneceu estável, com média de 1 ovo por dia por animal durante todo o período analisado. Normalmente, a capacidade de postura de galinhas é pouco afetada pela injeção do antígeno^{70 191, 125, 116}. Resultados similares foram descritos por Witkowski et al.¹⁹¹ que imunizaram aves com fragmentos de DNA de Pox vírus não observaram a presença de efeitos colaterais e nem a perda da capacidade de postura¹⁹¹ e por Matheis & Schade¹¹⁶ ao imunizarem galinhas com componentes acelulares de *B. pertussis* (toxóide pertussis, filamentos de hemaglutinina, pertactin e antígeno de fimbria), não detectaram queda da postura nos animais vacinados e nem efeitos colaterais decorrentes da imunização¹¹⁶.

Entretanto, já foi descrito que a utilização de antígenos contendo substâncias tóxicas pode diminuir ou até mesmo cessar a postura das aves⁷⁰. Schniering et al.¹⁴⁶ utilizaram antígenos de *Ascaris suum* na imunização de aves demonstraram que a capacidade de postura diminuiu até cessar por completo durante 3 semanas, devido a toxicidade do antígeno utilizado. O estresse devido ao protocolo de imunização também influi diretamente na capacidade de postura e conseqüentemente na produção de IgY^{63,70}. Levesque et al.¹²⁴ utilizaram adesina fimbrial (F4) de *E. coli enterotoxigênica* demonstraram ausência de efeitos colaterais, entretanto, foi detectada a queda na postura das aves logo após as doses vacinais, relacionadas ao estresse causado pelo processo de imunização. O adjuvante utilizado na imunização também pode influir diretamente na queda de postura. Normalmente, o ACF é o mais incriminado pela queda de postura de aves durante o processo de imunização¹⁹⁶, fato que não foi observado neste trabalho ao utilizar ACF em associação a AIF.

de Paula et al.¹²⁵ para evitar a queda da postura das aves devido ao processo de imunização, vacinaram as aves antes do início do período de postura, onde a primeira dose foi administrada aos 14 dias de vida da ave e a última, 30 dias antes do início da postura, não sendo detectado efeitos colaterais ou queda da postura devido a imunização em todas as aves estudadas. Entretanto, neste trabalho a imunização ocorreu de forma mais tardia de 18 a 20 semanas de idade, próximo ao período de início da postura, que é iniciado aproximadamente com 22 semanas de idade, sem a observação de alterações ou queda da postura desses animais durante e após o processo de imunização¹²⁵.

Após a imunização completa, foi demonstrado um perfil constante de concentração de IgY isolada, sem diferença significativa (teste de Kruskal-wallis, $H=1,57$, $p>0,05$) e sem oscilação durante os quatro meses analisados, o que evidenciou a qualidade e a repetibilidade do método de isolamento por PEG escolhido para este estudo, além da efetividade do protocolo vacinal utilizado, o qual utilizando somente três doses gerou uma resposta rápida elevada e constante no período analisado.

Neste trabalho a concentração de IgY obtida variou de 14,28 a 65,48 mg/mL, com média de 39,02 mg de IgY/mL. Resultados similares foram encontrados por Pauly et al.¹¹⁴ ao imunizarem galinhas Legorn com toxinas (ricina e toxina botulínica) utilizando como adjuvante na primeira imunização ACF associado a AIC nos reforços subsequentes, obtendo concentrações de IgY isolada por precipitação por PEG de 30 mg/mL no início do experimento chegando até a concentração de 80 mg/mL ao final de

dois anos. Níveis similares são descritos também em outros trabalhos utilizando precipitação com PEG ^{63, 125}. Entretanto, Akita & Nakai, ¹⁰⁸ ao compararem a efetividade do método de purificação utilizando água com a precipitação por PEG, dextran sulfato e alginato, demonstraram que o método mais eficiente de purificação foi o que utilizou água com 91% de rendimento e 31 % de pureza e atividade similar aos outros métodos. Bizhanov et al. ⁶⁷ desenvolveram dois métodos de purificação para IgY, a precipitação por sulfato de lítio e por citrato de sódio e compararam com a purificação por PEG e clorofórmio. Os resultados demonstraram que a precipitação por sulfato de lítio foi a mais eficiente, purificando IgY em grande quantidade e com o melhor grau de pureza (94%), quando comparado aos outros ⁶⁷.

Mesmo que métodos mais eficientes já tenham sido descritos para isolamento de IgY ^{108, 197,67}, a metodologia de precipitação com PEG foi escolhida, por isolar IgY com alta pureza e devido ao baixo custo e a facilidade do processamento das amostras. A concentração de IgY parece estar associada a fatores como a raça da galinha, o peso do ovo, o método de extração e de quantificação utilizados ⁷⁵. Embora nem toda IgY contida na gema seja isolada por PEG ¹⁹⁷, os resultados obtidos demonstraram um bom nível de produção. A precipitação utilizando PEG gera muitas discussões quanto a sua efetividade. Diferentes taxas de recuperação que vão de 15 a 150 mg de IgY/ ovo já foram descritas ^{202, 197, 75}, o que se enquadra nas taxas de IgY recuperadas em nosso trabalho utilizando esse método, 97,55 mg de IgY/gema. Em relação a IgG extraída de sangue de coelhos, um volume máximo de 40 mL pode ser coletado em intervalos de quatro semanas com risco de morte do animal, o que corresponde a 20 mL de soro com aproximadamente 12 mg/mL de IgG ¹¹⁶. Num período de quatro meses utilizando um coelho, seriam produzidos 960 mg de IgG em 160 mL de sangue, enquanto que neste trabalho, neste mesmo período, uma única galinha produziu ovos que possibilitou a extração de 1,9g de IgY.

Apesar da falta de consenso sobre peso molecular da IgY pela maioria dos autores, na eletroforese de proteínas, a IgY anti-IgG canina apresentou-se em concordância com a estrutura padrão descrita ^{65, 59}. Apesar da obtenção de um bom resultado no processo de isolamento utilizando a precipitação por PEG, a presença de proteínas acessórias mesmo que em pequena quantidade, representam impurezas que não foram eliminadas neste procedimento. Por isso, um processo de purificação suplementar se justificou para a retirada destas, que podem interferir no processo de reconhecimento da IgY ao antígeno contra a qual foi produzida, além de interferir

diretamente em processos de conjugação com diferentes tipos de enzimas e fluorocromos ⁶³. A purificação por adsorção tiofílica originou um anticorpo mais puro, onde pôde ser verificada a remoção da maioria das referidas bandas proteicas acessórias sem alteração do perfil eletroforético apresentado após o isolamento. A presença de bandas entre 56,2 kDa e 35,8 kDa, que não foram removidas após o processo de purificação, foi descrita por outros autores como Pauly et al. ¹³⁴ e Matheis & Schade ¹¹⁶ as quais provavelmente correspondem ao fragmento C-terminal do precursor da vitelogenina II ¹⁹⁸. Esses fragmentos não foram capazes de interferir nas atividades de reconhecimento da IgY produzida ao antígeno imunizante realizadas neste estudo, como também em nenhum dos outros estudos em que foram descritos ^{134, 116}.

Devido à distância filogenética entre aves e mamíferos ⁵⁹, as galinhas são capazes de produzir anticorpos específicos contra antígenos de mamíferos altamente conservados, diferentemente de coelhos ⁷⁰, gerando títulos estáveis por várias semanas ⁶³. A cinética de produção em aves geralmente demonstra um aumento transitório do título após a primeira imunização, já nas imunizações subsequentes, pode ser notado um aumento inicial com aproximadamente 10 dias, gerando um platô por mais dez dias seguido de declínio ⁷⁰. Resultados distintos foram demonstrados neste trabalho, pois 20 dias após a última imunização foram demonstrados títulos elevados de IgY específica com um aumento significativo para o segundo mês após a imunização (teste de Kruskal-wallis, $H=17,86$; $p<0,05$), a partir do qual ocorreu um pico de produção que permaneceu estável por três meses após a imunização (teste de Kruskal-wallis, $H= 17,86$; $p >0,05$). Isto demonstrou que o protocolo de imunização utilizado foi efetivo, podendo-se obter níveis estáveis e elevados de IgY até o quarto mês após imunização completa, sem queda dos níveis de anticorpos e sem a necessidade de imunizações subsequentes durante este período.

Bizanov et al. ⁶⁷ ao produzirem uma IgY anti-IgG de suíno utilizando ACF na primeira dose e AIF nas subsequentes demonstraram pico de produção mais precoce, um mês após a vacinação completa, entretanto demonstraram também um declínio de produção dois meses após a última dose, mais precoce quando comparado ao deste estudo ⁶⁷. Kritratanasak et al. ¹⁹² utilizando ACF na primeira imunização e AIC nas duas subsequentes produziram uma IgY anti-IgG rato. Demonstram uma maior produção de IgY somente após a terceira imunização, com a elevação de títulos mais tardia, um mês após as três doses, com pico de produção dois meses após a vacinação completa e formação de um platô estável de produção de IgY do segundo ao quinto mês, seguido de

declínio de produção. Bollen et al. ¹²² ao produzirem uma IgY anti-IgG humana, demonstraram títulos de IgY significativamente altos e sem declínio por até 1 ano utilizando ACF na primeira imunização, com subseqüentes injeções mensais de IgG em salina, além de uma dose de IgG utilizando AIF como adjuvante depois do sexto mês da primeira imunização ¹²².

O sucesso da produção de anticorpos policlonais depende de vários fatores relacionados à imunização, um dos principais está relacionado com a qualidade e a quantidade do antígeno utilizado. Este deve ser o mais purificado possível para evitar reações indesejadas ¹¹⁹. Seguindo este preceito, optou-se por imunizar as aves com IgG com um alto grau de pureza, evitando que os animais entrassem em contato com interferentes decorrentes da purificação da IgG canina proveniente do soro. A quantidade do antígeno parece ser relevante para estimular a resposta imunológica. As doses ideais oscilam entre 10 µg a 1 mg ⁶³. Neste trabalho a concentração de antígeno escolhido foi determinada de acordo com resultados obtidos de trabalhos anteriores por nosso grupo ¹⁹⁹.

A seleção do adjuvante é outro fator que interfere diretamente na produção de altos níveis de anticorpos na gema ⁵⁹, por promoverem a resposta celular, humoral e memória imunológica ⁶³. O ACF é o mais efetivo para produção de anticorpos em animais de laboratório. Causa severos efeitos adversos em mamíferos, mas nas aves é o mais efetivo em induzir altos e sustentáveis níveis de IgY na gema ⁶³. As aves são mais resistentes que os mamíferos aos danos teciduais causados pelo ACF. Para que isso seja evitado, a utilização do AIF em substituição é efetiva ⁵⁸. A combinação do ACF na primeira imunização e do AIF nas subseqüentes é preferível para evitar efeitos adversos e ainda induzir níveis elevados de IgY ^{120,121,58}.

Em relação a especificidade frente ao antígeno imunizante da IgY produzida, a reação de imunodifusão dupla de Ouchterlony não demonstrou ser uma técnica adequada para verificar a presença de IgY específica isolada da gema, isto porque não houve a detecção de linhas de precipitação em nenhum dos géis analisados, mesmo quando a quantidade de sal foi aumentada. A IgY raramente é capaz de precipitar e aglutinar antígenos ⁵⁹, o que se deve a sua falta de habilidade em produzir complexos imunes precipitantes. Segundo Warr et al. ⁶⁵ e Schade et al. ⁵⁹ alguma atividade precipitante da IgY pode ser observada aumentando a concentração de sal do meio,

embora isto tenha sido realizado neste estudo e nenhum resultado positivo tenha sido observado.

Jensenius et al.¹³⁶ descreveram que a utilização de PEG numa concentração de 5% poderia favorecer a precipitação da molécula. Entretanto, Araujo, (2007) utilizando uma IgY anti-veneno botrópico não observou linhas de precipitação nem com o aumento da concentração de sal, nem com a adição de PEG. Esta inabilidade da molécula de IgY em precipitar proteínas pode ser explicada devido a sua estrutura, que não apresenta uma mobilidade adequada por não possuir região de dobradiça. Esta característica provavelmente limita a flexibilidade, dificultando a ligação do antígeno com seus respectivos sítios de ligação. A maioria dos trabalhos em que a imunodifusão foi realizada com sucesso utilizavam uma anti-IgY proveniente de mamíferos, ou seja, esta condição poderia fazer com que a IgY se comportasse como antígeno, não necessitando de flexibilidade para ligação ao antígeno, o que justificaria a presença da linha de precipitação^{200, 201, 202, 67}.

No ELISA, títulos de IgY até a diluição 1:51200 (0,08 µg de IgY), utilizando uma diluição de 1:40959 (0,05 µg) de IgG canina foram detectados tanto para a IgY isolada quanto para a purificada, o que revelou uma excelente especificidade da IgY produzida frente ao antígeno imunizante, sem a ocorrência de prejuízos mesmo após o processo de purificação. Esses resultados deixaram claro o excelente reconhecimento entre IgY e IgG, com a capacidade de ligação entre as duas imunoglobulinas, que ocorreu até mesmo nas diluições com menor concentração de IgG (antígeno) e IgY. Resultados distintos, com títulos inferiores, foram descritos por Hatta et al.⁹⁵ ao produzirem uma IgY contra rotavirus humano utilizando somente ACF como adjuvante, neste experimento, foram encontrado títulos de neutralização para dois sorotipos diferentes de 1:13000 e 1:15000 respectivamente.

Títulos mais elevados são normalmente descritos na literatura. A produção de uma IgY anti-IgG de rato, utilizando ACF e AIC demonstrou títulos de até 1: 250000¹⁹². Pauly et al.¹¹⁴ demonstraram títulos estáveis de IgY até 1000 000 no ELISA vacinando galinhas utilizando ACF na primeira imunização e AIF nas subsequentes, já Tu et al.²⁰³ produziram uma IgY anti-lactoferrina bovina, utilizando ACF na primeira imunização de AIC nas subsequentes, encontrando títulos estáveis até a décima sexta semana após a primeira imunização de $1,68 \times 10^8$. Vale lembrar que o desenvolvimento dos títulos de IgY neste trabalho foram decorrentes de somente três imunizações,

diferente dos resultados dos trabalhos descritos anteriormente que utilizaram quantidades superiores de doses imunizantes. Hatta et al.⁹⁵ utilizaram quatro imunizações com intervalos de duas semanas cada, Tu et al.²⁰³ utilizaram sete doses com intervalos semanais, Pauly et al.¹¹⁴ utilizaram treze doses com intervalo de quatro a oito semanas entre elas, já Kritratanasak et al.¹⁹² entretanto, utilizaram de forma semelhante três doses com intervalos de duas semanas, encontrando títulos superiores de IgY quando comparado ao nosso estudo¹⁹².

A IgY purificada produzida foi capaz de reconhecer de maneira eficaz e específica a IgG canina purificada por meio do *western blot*. Foram visualizadas além da cadeia leve (22kDa) e da cadeia pesada (55 kDa) da IgG²⁰⁴, outras proteínas tanto para a IgG purificada quanto para a proveniente de soro de cão, isto porque a IgY é capaz de reconhecer epítomos de forma mais efetiva quando proteínas de mamíferos são utilizados com antígenos²⁰⁵. Além disso, não foi verificada a ligação da IgY com IgG de outras espécies animais, característica comumente descrita, nas imunoglobulinas produzidas por mamíferos, que apresentam reação cruzada com IgG de diferentes espécies¹¹². Esses resultados demonstram a forte sensibilidade e especificidade da IgY produzida frente a IgG canina purificada e presente no soro, determinando seu excelente desempenho como imunorreagente diagnóstico. Resultados distintos foram descritos por Nikbakht et al.¹⁹³ ao produzirem uma IgY anti-IgG de camelo. Foi observado no *western blot* um forte reconhecimento da IgY frente a cadeia pesada e leve de IgG de soro de camelo, entretanto a IgY produzida foi capaz de reconhecer também a cadeia pesada da IgG do soro de bovino, equino e ovino, demonstrando identidade aos diferentes epítomos das IgG dessas espécies no *western blot*. Fato que não foi descrito na imunodifusão, onde a IgY proveniente do soro das galinhas não reagiram com as IgG provenientes dos mesmos soros testados no *western blot*¹⁹³.

Descrições de resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo, em que a IgY foi capaz de reconhecer com especificidade o antígeno imunizante, são comuns na literatura. De Paula et al.¹²⁵ produziram uma IgY anti-vírus da hepatite A que no *western blot* foi capaz de detectar com especificidade as proteínas do vírus. Gassmann et al.²¹⁹ encontraram reconhecimento no *western blot* quando produziram uma IgY anti-PCNA (antígeno que é responsável pela proliferação celular em células eucariotas) capaz de detectá-la por meio do *western blot* 20 dias após a primeira imunização das aves. Da mesma forma, Tini et al.¹⁰⁴ revelaram que a IgY anti-HIF 1 α (proteína de células eucariotas que regula genes responsáveis pela adaptação a situações de hipóxia)

reconheceu no *western-blot* a proteína em células de humanos, macacos, suínos, cães e ratos submetidas a situação de hipoxia ¹⁰⁴.

A detecção de IgY específica na gema dos ovos das aves imunizadas, através de método de isolamento e purificação que revelaram uma molécula com grau de pureza adequado, associado a excelente especificidade frente ao antígeno imunizante, demonstrada por ELISA e *western blot*, em conjunto com a produção constante e em grande quantidade durante os quatro meses analisados, demonstraram que a tecnologia de produção de IgY é uma excelente alternativa para produção de anticorpos.

Mesmo utilizando método de conjugação desenvolvido para imunoglobulinas de mamíferos, a ligação com a peroxidase ocorreu sem danos a sua estrutura molecular, gerando um conjugado de qualidade adequada e funcional. A IgY demonstrou capacidade de discriminação das amostras positivas e negativas para LVC em todas as diluições frente a todas as concentrações de antígeno testadas. São descritos na literatura relatos de conjugação da IgY a diferentes enzimas e fluorocromos gerando de forma similar conjugados de qualidade adequada como apresentado neste estudo ⁶³, entretanto é muito mais comum sua utilização como anticorpo de captura ^{206, 144, 142, 207, 208, 209}. A IgY, além da peroxidase, já foi acoplada a biotina ⁶³, fluoresceína ¹⁰⁶, ouro coloidal ¹⁵⁴ e partículas magnéticas ²¹⁰, gerando um conjugado de qualidade comparável ou muitas vezes superior a IgG de mamíferos ^{63, 106, 154, 210}.

Neste estudo a diluição do conjugado IgY-HRP selecionada por titulação foi a de 1:1500, a melhor em diferenciar amostras positivas e negativas, além de demonstrar valores adequados para o branco. Resultados semelhantes foram descritos por da Silva ²¹¹ que produziram um conjugado IgY anti-vírus da hepatite A ligado a peroxidase, para um ELISA competitivo, encontrando como melhor diluição do conjugado a de 1:1000. Da mesma forma, Sherif et al. ²¹⁷ ao produzirem uma IgY anti-IgG de coelho isolada por precipitação por sulfato de amônia e purificação por cromatografia de afinidade, demonstraram no ELISA que a IgY produzida conjugada a enzima peroxidase em uma diluição de 1:2500 revelou excelentes resultados, demonstrando a eficiência em detectar tanto antígenos quanto anticorpos. A diluição usada para o conjugado IgG foi mil vezes mais elevada (1:150 000) em relação a IgY, revelando que a utilização da IgY como conjugado exige diluições mais concentradas para um conjugado funcional. Entretanto, esta diluição mesmo que mais concentrada apresentou resultados satisfatórios e idênticos em relação à acurácia quando comparado ao conjugado produzido em

mamíferos e superiores quando a repetibilidade e comparação das duplicatas foram analisadas nos dois conjugados.

A alteração da concentração da proteína bloqueadora do teste, de 1% para 2% de caseína gerou um resultado de melhor qualidade, retirando a cor de fundo do ensaio, sem alteração dos parâmetros de leituras das amostras negativas e positivas. Situação semelhante foi descrita por da Silva ²¹¹, que utilizou a IgY isolada apenas por precipitação com PEG como anticorpo de captura e de detecção em ELISA para o diagnóstico da Hepatite A humana, relatando a presença de coloração de fundo e pouca diferença entre as leituras dos controles positivo e negativo. Para solucionar este problema, foi utilizada uma etapa de bloqueio contendo PBS com 5% de soroalbumina bovina (BSA), que foi capaz de reduzir as reações inespecíficas, diminuindo a cor de fundo e, conseqüentemente, aumentando a diferença de leitura dos controles positivo e negativo. Neste estudo, para o diagnóstico da LVC, com o aumento da concentração da proteína bloqueadora, não foi detectada reação de fundo em nenhum dos ensaios realizados. A presença de interferentes no isolamento da IgY com PEG (bandas entre 56,2 e 35,8 kDa), presentes na molécula de IgY não removidas, nem mesmo após a purificação por adsorção tiofílica, podem explicar a reação de fundo observada no ELISA IgY-HRP com 1% de caseína, ao ligarem-se aos espaços disponíveis da placa, gerando reações inespecíficas.

A LV é uma doença em franca expansão que tem o cão como seu principal reservatório doméstico⁷. Os métodos de diagnóstico sorológico são ainda, as ferramentas mais realistas e aplicáveis nas pesquisas epidemiológicas e clínicas para identificação de cães infectados⁵⁷, por isso, todos os esforços no intuito de melhorar o diagnóstico para a identificação de um cão infectado são necessários. A melhora da qualidade dos anticorpos secundários não parece ser de interesse da maioria das pesquisas realizadas na área, já que as imunoglobulinas de mamíferos são as mais utilizadas como anticorpo secundário e tem sua utilização já estabelecida no diagnóstico da LVC. O ELISA IgY-HRP foi proposto como uma alternativa ao ELISA convencional a ser testado para LVC.

Os parâmetros de acurácia tanto do ELISA IgY-HRP quanto ELISA IgG-HRP demonstraram, pela análise da curva ROC, valores de 100% de sensibilidade, 100% de especificidade e 100% de eficiência. Esses resultados revelaram o excelente efeito da utilização da IgY como conjugado e sua qualidade no teste ELISA para LVC,

compatível com a IgG tradicional, demonstrando que o ELISA IgY-HRP pode ser uma alternativa eficaz ao ELISA tradicional no reconhecimento de cães infectados. A correlação entre as leituras das duplicatas revelaram um maior agrupamento e maior concordância dos valores no ELISA IgY-HRP. O ELISA IgY-HRP demonstrou ainda uma repetibilidade estatisticamente melhor ($p < 0,0001$) quando comparado ao ELISA IgG-HRP, revelando novamente um maior agrupamento das amostras positivas e negativas quando comparado ao ELISA IgG-HRP. Esses resultados evidenciam a superior efetividade da IgY como conjugado, dando origem a resultados mais homogêneos, diminuindo a chance de interpretações errôneas e resultados falsos.

Parâmetros inferiores foram descritos por da Silva ²¹¹ que utilizou uma IgY anti-vírus da hepatite A humana para desenvolver um ELISA competitivo, utilizando amostras de soros de pacientes sorologicamente negativos (100) e positivos (100) provenientes de um surto. Foi utilizado como anticorpo de captura a IgY purificada por precipitação com PEG e como anticorpo de detecção a mesma IgY foi conjugada a peroxidase. Esse teste demonstrou 84 % de sensibilidade e 79% de especificidade com eficiência de 81,5%, e o conjugado produzido foi considerado de qualidade e o ELISA descrito como teste alternativo para o diagnóstico da hepatite A em humanos ²¹¹.

Veerasami et al. ²¹² descreveram um ELISA para a detecção do vírus da febre aftosa. Neste ensaio, foram produzidos Mab e IgY específicos contra o vírus. O Mab foi utilizado como anticorpo de captura e a IgY foi acoplada a peroxidase de rabanete (HRP) e utilizada como conjugado. O ELISA Mab-IgY demonstrou 100% de especificidade e 98,87% de sensibilidade ao utilizar amostras clínicas de epitélio de língua de bovinos infectados e células de cultura infectadas, confirmados por RT-PCR ²¹².

Pokovorá et al. ²¹³ produziram um ELISA utilizando IgY anti-parvovírus canino (CPV-2), para a detecção do vírus nas fezes de cães clinicamente saudáveis e de filhotes com sinais de gastroenterite. A IgY funcionou como anticorpo de captura do vírus e como anticorpo de detecção quando conjugada a enzima peroxidase. O ELISA foi testado em 96 amostras no total, 34 saudáveis e 62 com sinais de gastroenterite, o ponto de corte em absorbância foi de 0,200. A sensibilidade do teste foi de 68,9% considerada baixa e quando comparada com a hemoaglutinação, houve 100% de concordância nas amostras com leituras em absorbância acima de 0,256, já nas amostras com títulos mais baixos e negativas na hemaglutinação, estas demonstraram resultados negativos no ELISA ²¹³.

Os testes convencionais de ELISA para LVC demonstram diferentes padrões de acurácia, dependendo do tipo de antígeno utilizado, podendo apresentar níveis de sensibilidade que variam entre 80% e 99,5% e uma especificidade entre 81% e 100%¹⁸⁴¹⁸⁵. Utilizando imunoglobulinas de mamíferos anti IgG canina conjugada a peroxidase, Rosário et al.²¹⁴ desenvolveram um ELISA com antígeno bruto de *L. (L.) chagasi infantum* e revelaram nas amostras de soros analisadas sensibilidade de 98% e especificidade de 100%²¹⁴. Já Cândido et al.²¹⁵ utilizando as mesmas condições revelaram no ELISA 90% de sensibilidade e 93,3% de especificidade nos cães assintomáticos analisados e 86,7% de sensibilidade e 100% de especificidade para cães oligossintomáticos analisados²¹⁵. Esses resultados quando comparados aos obtidos neste estudo revelam-se menores quando a IgY-HRP é utilizada, onde valores máximos são encontrados. Vale lembrar ainda, que o ELISA IgY-HRP não só repetiu os resultados do ELISA-IgG HRP realizado em conjunto, mas também, os resultados do teste EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz, preconizado pelo Ministério da Saúde como teste de triagem para a LVC no país⁶ considerado um dos critérios de seleção para a escolha das amostras trabalhadas.

Visando um estudo de validação interna, foram utilizadas amostras negativas provenientes de área de baixa endemicidade, já que no estado do Rio de Janeiro, embora não sejam descritos, atualmente, casos humanos de LV, casos caninos são freqüentemente diagnosticados, tendo-se observado um aumento nos índices de soroprevalência canina em algumas regiões endêmicas, além da descrição de novos casos em outras cidades do estado, onde não existiam casos autóctones²¹⁶. A população controle utilizada no estudo, tem características semelhantes à população infectada (grupo LVC), o que ocorre em condições naturais. Ambos os testes apresentaram valores máximos nos parâmetros sorológicos, no entanto, o ELISA IgY-HRP revelou-se mais eficiente que o ELISA IgG-HRP, quando a correlação e a repetibilidade das amostras foram analisadas, podendo portanto, ser utilizado na rotina sorodiagnóstica da LVC.

6- Conclusões

- ❖ O protocolo de imunização utilizado foi adequado, pois não gerou efeitos adversos nos animais, que se mantiveram sem lesões e com comportamento compatível com a espécie, além de não ter sido detectada a queda de postura dos ovos.
- ❖ O protocolo de imunização utilizado gerou uma produção de IgY elevada e constante durante o período analisado.
- ❖ A combinação do método de isolamento com PEG e da purificação por adsorção tiofílica foi eficaz para a produção de IgY com grau de pureza adequado.
- ❖ A IgY produzida não gerou reações cruzadas sendo específica para a IgG canina.
- ❖ O método de conjugação utilizado para imunoglobulinas de mamíferos pode ser empregado para IgY sem alteração da sua estrutura ou da capacidade de ligação ao antígeno correspondente.
- ❖ Todos os parâmetros sorológicos avaliados com o ELISA IgY-HRP apresentaram valores máximos.
- ❖ A comparação dos parâmetros sorológicos do ELISA IgY-HRP frente ao ELISA convencional foi idêntica.
- ❖ Em comparação com o ELISA convencional, o ELISA utilizando IgY-HRP demonstrou uma melhor repetibilidade e concordância entre as duplicatas nas duas observações realizadas.

7- Bibliografia

- 1- Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Melo M. Leishmanial infection: Analysis of first steps. A review. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(7): 861-870.
- 2- Handman E. Leishmaniasis: Current status of development. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 229-243.
- 3- Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. Vet J. 2008; 175(1): 45-52.
- 4- Rotureau B. Are New World leishmaniasis becoming anthroponosis? Med Hypotheses. 2006; 67: 1235-1241.
- 5- WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO; 2010. 201p. Report n°.: 949.
- 6- MS-SINAN-Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ed. Ministério da Saúde. 2006. 122p.
- 7- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005; 35: 1169-1180.
- 8- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res. 2004; 119: 238-258.
- 9- Neves DP. Leishmaniose Americana. Parasitologia Humana. 10^a ed. Brasil: Atheneu; 2002. 428p.
- 10- Chagas E, Cunha A, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Paugarten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1937; 33: 89-229.
- 11- Deane M P, Deane L M. Experimental *Phlebotomus longipalpis* infection in a human case of visceral leishmaniasis. Hospital (Rio de Janeiro). 1954; 46(5): 487-489.

- 12- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88 (4): 491-493.
- 13- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006; 135(2-3): 100-107.
- 14- Tesh R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52: 287-292.
- 15- Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire R R, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002; 104: 275-285.
- 16- Palatnik de Sousa CB, Santos WR, França-Brasil C, Da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Med Hyg.* 2001; 65(5): 510-517.
- 17- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE., Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum* specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 2001; 96: 265-276.
- 18- Atlet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C, Sanchez A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infct Immun.* 2002; 70(6): 2763-2771.
- 19- Quinnell RJ, Kennedy LJ., Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics.* 2003; 55(1): 23-28.

- 20- Moreira Jr ED, De Sousa VMM, Sreenivasan M, Nascimento EG, De Carvalho LP. Assessment of optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol.* 2004; 122:245-252.
- 21- Freitas E, Melo M N, Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmaniainfantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol.* 2006; 137: 159-167.
- 22- SVS-Ministério da Saúde [Internet] Brasil: Ministério da Saúde; 2011a [em 29/10/2011]. Em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_areas_transmissao_lv_07_10_10.pdf.
- 23- Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring?. *Trends Parasitol.* 2005; 22(1): 4-6.
- 24- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Med Hyg.* 1996; 55(2): 125-130.
- 25- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1314-1320.
- 26- OMS-Organização Mundial da Saúde. Lucha contra las leishmanioses. Série de informes Técnicos. 1990; 793: 1-177.
- 27- Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica.* 2004; 92: 43-53.
- 28- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santana-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 1991; 77(4): 557-561.
- 29- Reis AB, Martins-Filho O A, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006a; 81: 68-75.

- 30- Baneth G, Aroch, I. Canine leishmaniasis-A diagnostic and clinical challenge. *Vet J.* 2008; 175(1): 45-52.
- 31- MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005; 127: 227-232.
- 32- Barrouin-Melo SM, Laranjeira DF, Filho, FAA, Trigo J, Julião FS, Franke CR, Aguiar PHP, Dos-Santos, WLC., Pontes-de-Carvalho L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J.* 2006; 171: 331-339.
- 33- Nogueira FS, Moreira MAB, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik de Sousa CB, Luvizotto MC. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine.* 2005; 23: 4805-4810.
- 34- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar, J, Bernardina W. Del Real, G., Ruitenber, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994; 62: 229-235.
- 35- Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid test (Kalazar Detec™) in dogs with and without signs of disease. *Acta Tropica.* 2008; 107: 205-207.
- 36- Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol.* 2006; 140: 54-60.
- 37- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity among naturally infected dogs to sandflies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci.* 2000; 69: 249-253.
- 38- Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995; 17: 451-458.

- 39-Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. J Vet Intern Med. 1999; 13(4): 330-334.
- 40- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. Vet Immunol Immunopathol. 2001; 79(3-4): 273-284.
- 41- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Clin Exp Immunol. 2006b;146(2):303-211.
- 42- Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. Vet Immunol Immunopathol. 2007; 117(1-2): 35-41.
- 43- Ribeiro FC, de O Schubach A, Mouta-Confort E, Schubach TM, Madeira FM, Marzochi MC. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. Vet Parasitol. 2007; 148(3-4): 200-206.
- 44-Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. Vet Parasitol. 2007; 147(1-2): 2-8.
- 45- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Atlet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J. A long experimental study of canine visceral leishmaniasis. Int J Parasitol. 2007.
- 46- Iniesta L, Gállego M, Portús M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. Vet Immunol Immunopathol. 2005; 103: 77-81.

- 47- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12): 552-557.
- 48- Chatterjee M, Baneth G, Jaffe CL, Sharma V, Mandal C. Diagnostic and prognostic potential of antibodies against O-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 70(1-2): 55-65.
- 49- Boni M, Davoust B, Dereure J. Intérêt des techniques de laboratoire dans le diagnostic de la leishmaniose canine. *Rev Franc Lab.* 1999; 310: 33-38.
- 50- Lamothe J, Gaudray CH, Zarka P. Diagnostic de la leishmaniose canine. *Prat Med Chir Anim Comp.* 2004; 39: 41-46.
- 51- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo C MF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol.* 2007; 146: 235-241.
- 52- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008; 158(4): 274-287.
- 53- Miró G, Cardoso L, Pennisi M G, Oliva C, Baneth G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitol.* 2008;24: 371-377.
- 54- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7(3): 338-349.
- 55- Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, Poletti P. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008; 31(6): 527-536.
- 56- Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, McAullife IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42(2): 118-123.
- 57- Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SH, Nunes CM. Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(5): 594-595.

- 58- Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2009; 13(2): 295-308.
- 59- Schade R, Hlinak A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *Altex.*,1996; 13(5): 5-9.
- 60- Carlander D. Avian IgY antibodies in vitro and in vivo [Dissertation]. [Sweden]: Uppsala university; 2002. 53p.
- 62- Leslie GA, Clem LW. Phylogen of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med.*1969; 130(6): 1337-1352.
- 61- Russel WMS, Burch R L. The principles of Humane Experimental Technique. London, UK: Methuen 1959.
- 63- Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A, Staak C. Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology. 1^o ed. Germany: Springer; 2000. 249 p.
- 64- Larsson A, Balow RT, Lindahl L, Forsberg P. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution —A review. *Poult.Sci.* 1993; 72:1807–1812.
- 65- Warr W, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today.* 1995; 16(8): 392-398.
- 66- Akita E M, Li-Chan EC. Isolation of bovine immunoglobulin G subclasses from milk, colostrum, and whey using immobilized egg yolk antibodies. *J Dairy Sci.*1998; 81(1): 54-63.
- 67- Bizanov G, Jonauskienė I, Hau J. A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. *J Lab Anim Sci.* 2004; 31(3): 121-130.
- 68- Narat M. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.*2003; 41(3): 259–267.
- 69- Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comp. Biochem PhysiolB.*1993; 106(2): 255-261.

- 70- Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and in human and veterinary medicine. *ATLA*. 2005; 33(2):129-154.
- 71- Carlander D, Stalberg J, Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci*. 1999; 104(3): 179-189.
- 72- Junior AB, Macari M. *Doenças das Aves*. 1º ed. Brasil:Facta; 2000. 490p.
- 74- Leslie GA, Martin N. Studies on the secretory immunologic system of fowl serum and secretory IgA of the chicken. *J Immunol*.1973; 110(1): 1-9.
- 75- Kitaguchi K, Osada K, Horio F, Murai A.Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008; 121(3-4): 290-299.
- 76- Reynaud CA, Anquez V, Dahan A, Weill JC. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell*. 1985; 40(2): 283-291.
- 77- Parvari R, Avivi A, Lentner F, Ziv E, Tel-Or S, Burstein Y, Schechter I. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J*. 1988; 7(3): 739–744.
- 78- Janeway CAJ, Walport M, Travers P. *Imunobiologia*. 7º edição Ed. Artes Médicas. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: 2010. 908 p.
- 79- Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, Weill JC.A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire.*Cell*.1987; 48(3):379-388.
- 80- Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, Weill JC. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell*.1989; 59(1):171-183.
- 81- Kowalczyk K, Daiss J, Helpem I, Routh TE. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in chicken.*Immunology*.1985; 19: 157-167.

- 82- Li X, Nakano T, Sunwoo HH, Paek BH, Chae HS, Sim JS. Effects of Egg and Yolk Weights on Yolk Antibody (IgY) Production in Laying Chickens. *Poultry Sci.*1998; 77(2): 266-70.
- 83- Stifani S, Nimpf J, Schneider WJ. Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken: cognate ligands and oocyte receptors. The binding site for vitellogenin is located on lipovitellin I. *J Biol Chem.*1990; 265(2): 882-888.
- 84 Mac Lachlan I, Nimpf J, Schneider WJ. Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *J Biol Chem.*1994; 269(39): 24127- 24132.
- 85- Jacobsen L, Hermann M, Vieira PM, Schneider WJ, Nimpf J. The chicken oocyte receptor for lipoprotein deposition recognizes alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem.* 1995; 270(12):6468-6475.
- 86- Vieira AV, Sanders EJ, Schneider WJ. Transport of serum transthyretin into chicken oocytes. A receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 1995; 270(7): 2952-2956.
- 87- Recheis B, Rumpler H, Schneider WJ, Nimpf J. Receptor-mediated transport and deposition of complement component C3 into developing chicken oocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(16):1871-1880.
- 88- Mohammed SM, Morrison S, Wims L, Trinh KR, Wildeman AG, Bonselaar J, Etches RJ. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology.* 1998; 4 (2): 115-25.
- 89- Morrison SL; Mohammed MS, Wims LA, Trinh R., Etches R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol Immunol.*2001; 38(8): 619-625.
- 90- Patterson R, Youngner JS, Weigle WO, Dixon FJ. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol.* 1962; 89: 272-278.
- 91- Woolley JA, Landon J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J Immunol Methods.*1995; 178 (2): 253-265.

- 92- Rose ME; Orlans E; Buttress N. Immunoglobulin classes on the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* 1974; 4: 521–523.
- 93- Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, Ozeki M, Tsuda K, Hatta H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992; 56(2): 270-274.
- 94- Shimizu M, Nakai S, Fitzsimmons RC. An-*E.coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* 1988; 5: 1360-1366.
- 95- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993; 57(3): 450-454
- 96- Lee KA, Chang SK, Lee YJ, Lee JH, Koo NS. Acid stability of anti- *Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35(5): 488-493.
- 97- Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 ; 9(5): 1061-1066.
- 98- Chang HM, Ou-Yang RF, Chen YT, Chen CC. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J Agric Food Chem.* 1999; 47(1): 61-66.
- 99- Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K, Suzuki T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. *J Food Sci.* 1994; 59(4): 763-772.
- 100- Jaradat ZW, Marquardt RR. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. *Food and Agricultural Immunology.* 2000; 12: 263-272.
- 101- Olovsson M, Larsson A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1993; 16(2): 145-152

- 102-Polson A, Von Wechmar MB, Van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun.* 1980; 9: 475-493.
- 103- Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Hidalgo- Alvarez RA.comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J Biomater Sci Polym.* Ed. 2000; 11(6): 657-673.
- 104- Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002; 131(3):569-574.
- 105- Carlander D, Kollberg H, Wejaker PE, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res.*2000; 21(1): 1-6.
- 106- Calzado EJG, Tomás TS, Ariza AM, Duarte GF, Clarke DH, González GS, Schade R. Obtención de un conjugado anti-IgG de ratón – FITC mediante latecnologíaIgY para uso como anticuerpo secundario em ladetección de antígenos de superficie celular. *CENIC Ciencias Biológicas.* 2007; 38(1): 85-89.
- 107- Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem.* 1991; 37(3): 411-414.
- 108- Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from egg laid by hens immunised with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods.*1993; 160: 207-214.
- 109- Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods.*1998; 215(1-2): 1-7.
- 110- Hoffman WL, Ruggles AO, Tabarya D. Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. *J Immunol Methods.* 1996; 198(1):67-77.

- 111- Svendsen L, Crowley A, Stodulski G, Hau J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J Immunol Methods*. 1996; 191(2): 113-120.
- 112- Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010; 135(3-4): 173-180.
- 113- Kummer A, Li-Chan EC. Application of an ELISA-elution assay as a screening tool for dissociation of yolk antibody-antigen complexes. *J Immunol Methods*. 1998; 211(1-2): 125-37.
- 114- Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult Sci*. 2009; 88(2): 281-90.
- 115- Chacana PA, Terzolo HR, Calzado EG, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2004; 85(5):179-189.
- 116- Matheis W, Schade R. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. *J Immunol Methods*. 2011; 369(1-2): 125-132.
- 117- Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food*. 2002; 5(3): 159-69.
- 118- Larsson A, Carlander D, Wilhelmsson M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Immunology*. 1998; 10: 29-36.
- 119- Leenaars MPPA, Hendriksen CFM, Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, Halder M, Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindblad EB, Nicklas W, Outschoorn IM, Stewart-Tull DES. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. *ATLA*. 1999; 27: 79-102.

- 120- Kapoor P, Compton MM, Howarth B. Immunization of chickens with quail and turkey perivitelline membrane proteins: production of antibodies and their effects on fertility. *Poult Sci.*2000; 79(2): 245-256.
- 121- Li XL, Shuai JB, Fang WH. Protection of *Carassius auratus Gibelio* against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. *J Zhejiang Univ Sci B.*2006; 7(11): 922-928.
- 122- Bollen LS, Crowley A, Stodulski G, Hau J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG a comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using different adjuvants *J Immunol. Methods.*1996, 191: 113-120.
- 123- Olbrich C, Müller RH, Tabatt K, Kayser O, Schulze C, Schade R. Stable biocompatible adjuvants--a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *Altex.*2002; 30(4): 443-458.
- 124- Levesque S, Martinez G, Fairbrother JMPS. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. 2007; 86(4): 630-635.
- 125- de Paula VS, da Silva AS, de Vasconcelos GA, Iff ET, Silva ME, Kappel LA, Cruz PB, Pinto MA. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *J Virol Methods.* 2011;171(1):102-106.
- 126- Conn PM. *Sourcebook of Models for Biomedical Research.* Ed. Humana Press.2008. 778 p.
- 127- Burley RW, Vadehra DV *The Avian Egg, Chemistry and Biology.* Ed. John Wiley. New York, USA. 1989. 472p.
- 128- Kovacs-Nolan J, Mine Y. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and Poultry Biology.* 2004; 15(1): 25-46.
- 129- Mc Cully KA, Mok CC, Common RH. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. *Can J Biochem Physiol.* 1962; 40(7): 937-952.

- 130- Bernardi G, Cook WH. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. *Biochim Biophys Acta*.1960; 44: 86-96.
- 131- Nilsson E, Hanrieder J, Bergquist J, Larsson A. Proteomic characterization of IgY preparations purified with a water dilution method.. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(24): 11638-11642.
- 132- Akerstrom B, Brodin T, Reis K, Björck L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol*.1985; 135(4): 2589-2592.
- 133- Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1. *FASEB J*.1999; 13(1): 81-88.
- 134- Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgYtechnology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethyleneglycol (PEG) precipitation. *J Vis Exp*. 2011; 51: 3084.
- 135- Svendsen L, Crowley A, Ostergaard LH, Stodulski G, Hau J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Altex*.1995; 45(1): 89-93.
- 136- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods*. 1981;46 (1): 63-8.
- 137- Chang HM, Lu TC, Chen CC, Tu YY, Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(4): 995-999.
- 138- Polson A; Coetzer T; Krugar Maltzahn von E; Merwe van der KJ. Improvements in the isolation of IgY from the yolk of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations*.1985; 14: 323-327.
- 139- Chuanjing W, Rong-Jiang Y, Ji Z, Shing B, Li Z, Pinggan Z, Yongrong M, Jianping W, Qimin H. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody

raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *J Immunol Methods*.2003; 277: 157-169.

140- Gee SC, Bate IM, Thomas TM, Rylatt DB. The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. *Protein Expr Purif*. 2003; 30(2): 151-155.

141- Santoro ML, Barbaro KC, Flores da Rocha TR, Soares Torquato RJ, Hirata IY, Sano-Martins IS. Simultaneous isolation of platelet factor 4 and glycoprotein IIb-IIIa complex from rabbit platelets, and characterization of specific chicken antibodies to assay them. *J Immunol Methods*.2004; 284(1-2):55-72.

142- Brunda G, Sashidhar RB, Sarin RK. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom in biological samples of forensic origin. *Toxicon*.2006; 48(2): 183-194.

143- Gandhi S, Caplash N, Sharma P, Raman SC. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. *Biosens Bioelectron*. 2009; 25(2009): 502–505.

144- Baumgartner S, Bremer M, Kemmers-Voncken A, Smits N, Haasnoot W, Banks J, Reece P, Danks C, Tomkies V, Immerd U, Schmitt K, Krska R. Detection of hidden hazelnut protein in food by IgY-based indirect competitive enzyme-immunoassay. *Anal Chim Acta*. 2004; 520: 223–228

145- Rosol TJ, Steinmeyer CL, McCauley LK, Merryman JI, Werkmeister JR, Gröne A, Weckmann MT, Swayne DE, Capen CC. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). *Vet Immunol Immunopathol*. 1993; 35(3-4): 321-337.

146- Schniering A, Schade R, Hiepe T. Development of an IgY-based assay for the detection of *Ascaris-suum*-antigens. *ALTEX*. 1996; 13(5): 62-65.

147- Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R. *Bioactive Egg Compounds*. 1º ed. Germany: Springer; 2007. 319 p.

148- Araujo AS. Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha. [Dissertação]. [Belo Horizonte, MG]: Escola de Medicina Veterinária, UFMG; 2007. 57p.

- 149- Lindahl TL.; Festin R; Larsson A. Studies of fibrinogen binding to platelets by cytometry: an improved methods for studies of platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis*.1992; 68 (2): 221-225.
- 150- Larsson A, Wejaker PE, Forsberg P O. Peroxidase-labelling of chicken antibodies. *Food Agric Immunol*.1999; 11(1): 43-49.
- 151- Fortgens PH, Dennison C, Elliott E. Anti-cathepsin D chicken IgY antibodies: characterisation, cross-species reactivity and application in immunogold labelling of human splenic neutrophils and fibroblasts. *Immunopharmacology*. 1997; 36(2-3): 305-311.
- 152- Motoi Y, Inoue S, Hatta H, Sato K, Morimoto K, Yamada A. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis*.2005a; 58 (2):115-118.
- 153- Motoi Y, Sato K, Hatta H, Morimoto K, Inoue S, Yamada A. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*. 2005b; 23(23): 3026-3032.
- 154- Rudolf J, Führer M, Galler B, Ansari P, Hasenhindl C, Baumgartner S. Differences in usability of rabbit IgG and chicken IgY after clean-up and impact on gold labelling properties. *J Immunol Methods*.2009; 350(1-2): 79-88.
- 155- Lee DY, Cho YW, Kang SG, Shin SJ, Yoo HS. Development of a novel antigen capture-ELISA using IgY against porcine interleukin-6 and its application. *J Vet Sci*. 2004; 5(4): 337-343.
- 156- Kim SH, Park MK, Kim JY, Chuong PD, Lee YS, Yoon BS, Hwang KK, Lim YK. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria spp.* using specific flagella antibodies. *J Vet Sci*. 2005; 6(1): 41-46.
- 157- Nishinaka S, Akiba H, Nakamura M, Suzuki K, Suzuki T, Tsubokura K, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci*.1996; 58(11): 1053-1056.
- 158- Sasai K, Lillehoj HS, Matsuda H, Wergin WP. Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina*

sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8⁺ T lymphocytes in vitro. *J Parasitol.* 1996;82(1):82-7.

159- Matsushita K, Horiuchi H, Furusawa S, Horiuchi M, Shinagawa M, Matsuda H. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J Vet Med Sci.* 1998; 60 (6):777-779.

160- Matsuda H, Mitsuda H, Nakamura N, Furusawa S, Mohri S, Kitamoto T. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23 (3): 189-194.

161- Rahimi S, Shiraz ZM, Salehi TZ, Torshizi MAK, Grimes JL. Prevention of *Salmonella* Infection in Poultry by Specific Egg-Derived Antibody. *Int J Poult Sci* 6(4): 230-235, 2007.

162- Tsubokura K, Berndtson E, Bogstedt A, Kaijser B, Kim M, Ozeki M, Hammarström L. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clin Exp Immunol.* 1997; 108(3): 451-455.

163- Wiedemann W, Linckh E, Kühlmann R, Schmidt P, Losch U. Chicken Egg Antibodies for Prophylaxis and Therapy of Infectious Intestinal Diseases. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1991;38(4):283-91.

164- Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, Yokoyama H, Kodama Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res.* 1992; 53(11):2005-2008.

165- O'Farrelly C, Branton D, Wanke CA. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infect Immun.* 1992; 60(7):2593-2597.

166- Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, Icatlo FCJ, Kuroki M, Yokoyama H, Kodama Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet Microbiol.* 1997; 58(2-4): 105-111.

- 167- Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IR. Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9(5): 1061–1066.
- 168- Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK, Michalek SM. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res*.1997; 31(4): 268-274.
- 169- Cho YH, Lee JJ, Park IB, Huh CS, Baek YJ, Park J. Protective effect of microencapsulation consisting of multiple emulsification and heat gelation processes on immunoglobulin in yolk. *J Food Sci*. 2005; 70(2): 149-151.
- 170- Fryer J, Firca J, Leventhal J, Blondin B, Malcolm A, Ivancic D, Gandhi R, Shah A, Pao W, Abecassis M, Kaufman D, Stuart F, Anderson B. IgY anti-porcine endothelial cell antibodies effectively block human antiporcine xenoantibody binding. *Xenotransplantation*. 1999; 6(2): 98–109.
- 171- Walsh WE, Anderson BE, Ivancic D, Zhang Z, Piccini JP, Rodgers TG, Pao W, Freyer JP. Distribution of an immune response to chicken anti- α Gal immunoglobulin Y antibodies in wild-type and α Gal Knockout mice.2000; 101(4):467-473.
- 172- SUBPAV/SVS. Nota Técnica No 1 (26 de setembro 2011).
- 173- Borja-Cabrera GP, da Silva VO, da Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatnik de Sousa CB. The Fucose-Mannose Ligand-Elisa in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*.1999; 2: 296-301.
- 174- da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97(6): 678-682.
- 175- Barbosa-De-Deus R, Dos Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CA. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*.2002; 9(6): 1361-1366.

- 176- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7):2352-2356.
- 177- Mohebali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol.* 2004; 121(3-4): 239-245.
- 178- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- 179- Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1949; 26(4): 507-515.
- 180- Voller A; Bidwell DE, Bartlett ANN. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ.* 1976; 53: 55-65.
- 181- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 4350-4354.
- 182- Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase labeled, a new method of conjugation. *Journal of Histochemistry and Citochemistry.* 1974; 22: 1084-1091.
- 183- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50: 296-311.
- 184- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitology.* 1995; 59:13-21.
- 185- Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitology.* 1996; 65:1-9.

- 186- Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein mensurament with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.
- 187- Hommel M, Pekis W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 1978; 72: 213-218.
- 188- Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano NA. Survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80: 17-22.
- 189- Ayres M, Ayres M, Ayres L, Santos S. BioEstat 4.0. Aplicação Estatística nas Áreas das Ciências Biológica e Médica. 1º ed. Brasil: Sociedade Civil Mamirauá; 2005. 272 p.
- 190- Shrout PE, Fleiss JL. Interclass correlations: uses in assessing rater reliability. Pyschol Bull. 1979; 86: 420-428.
- 191- Witkowski PT, Bourquain DR, Hohn O, Schade R, Nitsche A. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. J Immunol Methods. 2009; 341 (1-2): 146-153.
- 192- Kritratanasak S, Chiampanichayakul S, Kasinrerker W. Production of IgY anti-mouse IgG antibodies from chicken eggs. Asian Pac J. Allergy Immunol. 2004; 22(1): 61-68.
- 193- Nikbakht GHB, Tabatabaei S, Khormali M, Ashrafi I. Characterization of IgY antibodies, developed in hens, directed against camel immunoglobulins. Int J Vet Res. 2009; 3: 37-41.
- 194- Nguyen S V, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to *Canine parvovirus-2* by specific antibody from chicken egg yolk. Can J Vet Res. 2006; 70(1): 62-64.
- 195- Griot-Wenk ME, Marti E, Racine B, Cramer R, Zurbriggen A, Weck AL, Lazary S. Characterization of two dog IgE-specific antibodies elicited by different recombinant fragments of the epsilon chain in hens. Vet Immunol Immunopathol. 1998; 64: 15-32.

196- Bollen LS, Hau J. Freund's complete adjuvant has a negative impact on egg laying frequency in immunised chickens. *In vivo*. 1999; 13(1):107-108.

197- Stalberg J, Larsson A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. *Ups J Med Sci*.2001; 106(2): 99-110.

198- (Klimentzou *et al.*,2006)

199- Silva VL. Imunobiologia aviária e aplicação da imunoglobulina Y (IgY) na soroepidemiologia das leishmanioses caninas. [Tese]. [Seropédica, Rio de Janeiro]: Biologia Animal, UFRRJ; 1999. 153p.

200- Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification 1992; 57(3): 629-634.

201- Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*.2000; 749(2): 233-242.

202- Bizhanov G, Vyshniauskis G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Vet Res Commun*. 2000; 24(2): 103-113.

203- Tu YY, Ma CY, Ho SB, Chen CC, Chang HM. Affinity Measurement of Lactoferrin (LF)-Anti-LF Immunoglobulin in Yolk (IgY) Complexes by Competitive Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (CI-ELISA). *J Food Drug Anal*.2006; 14(4): 379-384.

204- Walker JM. *The Protein Protocols Handbooks*. 2º ed. USA: Humana Press Inc; 2002. 1146 p.

²⁰⁵ (Svendsen & Hau, 1996).

206- de Ceuninck F, Pastoureau P, Agnellet S, Bonnet J, Vanhoutte PM. Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantification of YKL-40 (cartilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies. *J Immunol Methods*.2001; 252(1-2): 153-161.

- 207- Chen CC, TaiYC, ShenSC, TuYY, WuMC, Chang HM. Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using immunoglobulin in yolk (IgY) specific against bovine milk alkaline phosphatase. *Food Chemistry*.2006; 95(2): 213-220.
- 208- Campora CE, Hokama Y, Yabusaki K, Isobe M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ciguatoxin in fish tissue using chicken immunoglobulin Y. *J Clin Lab Anal*. 2008; 22(4): 239-245.
- 209- Duan ZH, Lin ZS, Yao HR, Gao YH, Zhang K, Zhao SQ, Zhu ZY. Preparation of Artificial Antigen and Egg Yolk-derived Immunoglobulin (IgY) of Citrinin for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Biom Env Sci*. 2009; 22: 237-243.
- 210- Lei JH, Liu WQ, Sun CS, Tang CL, Li MJ, Chen YL, Li YL. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with *Schistosoma japonicum* by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. *Acta Trop*. 2009; 111(1): 39-43.
- 211- da Silva AS. Ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da hepatite A utilizando IgY anti-HAV. [Dissertação]. [Rio de Janeiro]: IOC, Fundação Oswaldo Cruz; 2010. 86p.
- 212- Veerasami M, Singanallur NB, Thirumeni N, Rana SK, Shanmugham R, Ponselaran S, Muthukrishnan M, Villuppanoor SA. Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. *New Microbiol*. 2008; 31(4): 549-54.
- 213- Pokorova D, Franz J, Stepanek J. The use of egg yolk immunoglobulin in the diagnostics of canine parvovirus infections. *Veterinari Medicina*. 2000; 45: 49-54.
- 214- Rosário EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2005; 100(2): 197-203.
- 215- Cândido TC, Perri SH, Gerzoschkwitz O, Luvizotto MC, de Lima VM. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Vet Parasitol*. 2008; 157(3-4): 175-181.

216- Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Alessandra BA, Madeira MF. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(1): 77-78.

217- Sherif NA, Omar LM, Shafei SM, EI-Ebiary EA. Preparation and Evaluation of Anti-Rabbit IgY Peroxidase and FITC Conjugates. *Int J Virology.* 2005; 1(1): 51.

218- Araújo AS, Lobato ZI, Chávez-Olórtegui C, Velarde DT. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon.* 2010; 55(4): 739-744.

219- Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 1990; 4(8): 2528-2532.

220- Kovacs-Nolan J, Phillips M, Mine Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(22): 8421-8431.

221- Tizard, I. The Avian Antibody Response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 2002; 11 (1): 2-14.

222- SVS-Ministério da Saúde [Internet] Brasil: Ministério da Saúde; 2011b [em 29/10/2011]. Em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941.

8- Anexos:

ANEXO 1: Licença para utilização dos animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-19/10

Certificamos que o protocolo (P-33/10.3), intitulado "Obtenção de imunoglobulina Y para o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido em apoio a vigilância e controle da *leishmaniose visceral canina*", sob a responsabilidade de **FERNANDA NUNES SANTOS**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 05/07/2012 e inclui o uso total de:

Gallus gallus domesticus

- 2 fêmeas, peso: 1,800 Kg.

Rio de Janeiro, 26 de julho de 2010.

Dr^a. Norma V. Labarthe

Coordenadora CEUA/FIOCRUZ

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

1

ANEXO 2: Produção Científica

Ms. No. VETIMM-D-11-2666

Production of IgY against canine IgG: Perspective of a new tool for the immunodiagnostic of canine diseases

Veterinary Immunology and Immunopathology

Dear Mrs Santos,

I can now inform you that the Editorial Board has evaluated your manuscript. The Editor has advised that the manuscript will be reconsidered for publication after major revision.

The comments should be taken into account when revising the manuscript. Along with your revision, you will need to supply a response letter ('Revision Note'), which is a thorough, detailed response to the referees' comments, specifically noting each comment made by the referees and/or Editor, and describing all changes. Please indicate also where the modifications appear in the text (e.g. by specifying the line numbers) or clearly mark them in the revised manuscript (e.g. by using bold face, colour or underlining). Should you disagree with any comment(s), please explain why.

Please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for Veterinary Immunology and Immunopathology using the following combination:

<http://ees.elsevier.com/vetimm/>

Your username is: santosfn

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/VETIMM/automail_query.asp.

You will find your submission record under the menu item, 'Submissions Needing Revision.'

We are looking forward to receiving the revised submission.

Kind regards,

Cynthia L. Baldwin

Editor US

Veterinary Immunology and Immunopathology

PS:

Please note that your revised version should be returned within 6 months maximum. If anything prevents you from sending a revision within 6 months, please inform us.

ÁREA TEMÁTICA: DOENÇAS POR PROTOZOÁRIOS

P-1505

TÍTULO: PRODUÇÃO DE CONJUGADOS ENZIMÁTICO E FLUORESCENTE IGY ANTI-IGG PARA UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.

AUTOR(ES): FERNANDA NUNES SANTOS, VALMIR LAURENTINO SILVA, DCB-ENSP-FIOCRUZ, CLÁUDIA MORAES MOLINARO, SEICA-BIOMANGUINHOS-FIOCRUZ, EDINEA PASTRO MENDES, SEICA-BIOMANGUINHOS-FIOCRUZ, RAFAEL DE OLIVEIRA RESENDE, SEICA-BIOMANGUINHOS-FIOCRUZ, SIMONE DE AMORIM CHERMONT, SEICA-BIOMANGUINHOS-FIOCRUZ, SÉRGIO AUGUSTO DE MIRANDA CHAVES, DENSP-ENSP-FIOCRUZ,

INSTITUIÇÃO: DCB-ENSP-FIOCRUZ-RJ

Introdução: O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) tem se mostrado útil no controle epidemiológico e na redução de casos humanos e caninos. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é tradicionalmente utilizada e o ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido cada vez mais empregado no diagnóstico da LVC. Devido à necessidade de melhorar a qualidade do diagnóstico sorológico canino, novas ferramentas são necessárias para obtenção de testes mais sensíveis e específicos. Uma estratégia empregada atualmente é a tecnologia de IgY, que utiliza *Gallus gallus* como animal de produção de anticorpos, mostrando-se viável do ponto de vista ético e econômico na construção de kits de diagnóstico, em substituição aos mamíferos de uso habitual. Este trabalho teve por objetivo, realizar a conjugação da IgY anti-IgG canina para sua utilização como anticorpo secundário no ELISA e na RIFI. **Material e métodos:** Após purificação por polietilenoglicol, a IgY foi submetida a um processo de purificação adicional por adsorção tíflica utilizando o sistema IgY Hitrap purification- GE Healthcare. Seguindo instruções do fabricante, a IgY purificada eluída, foi submetida ao processo de conjugação com peroxidase de rabanete (HRP) e isotiocianato de fluoresceína (FITC). A eficiência da conjugação IgY-FITC foi medida através da razão F/P (fluoresceína/proteína).

Resultados: A IgY eluída do sistema de purificação, apresentou uma concentração final de 5,6 mg/mL, obtendo-se um total de 34 mg de IgY purificada. A titulação do conjugado IgY-HRP utilizando extrato bruto de *L.(L.) infantum* em concentrações crescentes de 1, 5, 10 e 20µg de proteínas/mL, frente a amostras séricas controle diluídas a 1:100, foi reacional até a diluição de 1:2000 diante de todas as concentrações antigênicas. Com relação ao conjugado IgY-FITC, utilizando-se filtros espectrofotométricos de 280 nm e 495 nm, foi determinada uma razão F/P de 7,9. A titulação do conjugado demonstrou fluorescência até a diluição de 1:80, utilizando os mesmos controles séricos diluídos a 1:40. Foi observada uma discriminação notável entre as amostras positivas e negativas com ambos conjugados. **Discussão:** Os resultados das titulações realizadas com os conjugados IgY foram semelhantes aos descritos em trabalhos anteriores, utilizando procedimentos semelhantes. Embora a razão de F/P encontrada no conjugado IgY-FITC tenha apresentado valor acima do esperado, este valor, mostrou-se adequado para este processo. **Conclusão:** As conjugações da IgY com a peroxidase e a fluoresceína ocorreram sem danos a sua estrutura e a sua capacidade de reconhecimento frente a IgG presente no soro de cães infectados, revelando sua potencialidade para utilização como anticorpo secundário no ELISA e na RIFI para o diagnóstico da LVC.

Apoio financeiro: Faperj

ÁREA TEMÁTICA: DOENÇAS POR PROTOZOÁRIOS

P-1506

TÍTULO: PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y ANTI-IGG CANINA PARA UTILIZAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: RESULTADOS PRELIMINARES.

AUTOR(ES): FERNANDA NUNES SANTOS, VALMIR LAURENTINO SILVA, DCB-ENSP-FIOCRUZ, PAULA BORBA CRUZ, IOC-FIOCRUZ, CLAÚDIA MORAES MOLINARO, SEICA-BIO MANGUINHOS- FIOCRUZ, SÉRGIO AUGUSTO DE MIRANDA CHAVES, DESNP-ENSP-FIOCRUZ,

INSTITUIÇÃO: DCB-ENSP-FIOCRUZ-RJ

Introdução: A leishmaniose visceral é uma doença de grande importância para saúde pública, sendo o cão o principal reservatório doméstico. O diagnóstico precoce da leishmaniose visceral canina (LVC), realizado principalmente por técnicas sorológicas, tem se mostrado útil no controle e na redução de casos humanos e caninos. Para um controle mais efetivo, novas estratégias são necessárias, uma das principais, seria o desenvolvimento de métodos diagnósticos simplificados, mais sensíveis e específicos, para a identificação do reservatório canino. Uma estratégia empregada atualmente é a tecnologia de IgY, que utiliza *Gallus gallus* como animal de produção de anticorpos em substituição aos mamíferos tradicionais, mostrando-se viável do ponto de vista ético e econômico na construção de kits de diagnóstico. Este trabalho tem o propósito de produzir, extrair e purificar IgY anti-IgG canina proveniente de ovos de *Gallus gallus*, a ser utilizada como anticorpo secundário em testes sorológicos para LVC. **Material e Métodos:** Imunização de aves, com IgG canina purificada, associada a adjuvante de Freund, em três doses. Vinte dias após o último inóculo, os ovos foram coletados, a IgY foi extraída da gema através de precipitação por polietilenoglicol. O perfil protéico e eletroforético, analisado por espectrofotometria e SDS-PAGE. A especificidade, aferida por western blot e ELISA. A produção de IgY específica mensurada por ELISA, até o quarto mês após a imunização completa das aves. Na análise dos resultados, foi utilizado teste de Kruskal-wallis com nível de significância de 5%. **Resultados:** Não foram detectadas anormalidades nos animais durante e após o processo de imunização. A concentração total de IgY, variou de 14,28 a 65,48 mg/mL, com média de 39,02 mg/mL. A cadeia pesada da IgY apresentou 60 KDa, enquanto a cadeia leve 24 KDa, com presença de bandas protéicas adicionais, representando impurezas não eliminadas no processo de purificação. No western blot foram visualizadas bandas de 216 a 18,4 Kda. Foi demonstrada uma interação marcante da IgY produzida frente a cadeia pesada (55 kda) e a cadeia leve (22 Kda) da IgG canina, ocorrendo ainda o reconhecimento de outras bandas não visualizadas no SDS-PAGE. A IgY produzida demonstrou reatividade frente a IgG canina até a diluição 1:51000, utilizando uma diluição de 1:41000 de IgG canina. A produção de IgY específica apresentou um aumento significativo do primeiro para o segundo mês ($H=17,86$; $p<0,05$), a partir do qual, ocorreu um pico de produção que permaneceu estável até o final da coleta ($H= 17,86$; $p>0,05$). **Discussão:** O perfil eletroforético da IgY apresentado corrobora com os trabalhos descritos anteriormente, bem como a cinética de sua produção após imunização. **Conclusão:** A forte reatividade da IgY e a capacidade de detectar pequenas quantidades de IgG canina demonstram a sua potencialidade para utilização como anticorpo secundário em testes de imunodiagnóstico para LVC.

Apoio financeiro: Faperj.

ANEXO 3: Produção científica

L - D 33

PRODUÇÃO DE CONJUGADO ENZIMÁTICO IgY EM APOIO AO IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Fernanda Nunes Santos¹, Valmir Laurentino Silva¹, Claudia Bezerra da Silva¹, Paula Borba Cruz², Cláudia Moraes Molinaro³, Eliame Mouta Confort⁴, Maria de Fátima Madeira⁴, Sérgio Augusto de Miranda Chaves⁵.

1–DCB-Ensp-Fiocruz, RJ, 2–IOC -Fiocruz, RJ, 3–Seica-Bio-Manguinhos-Fiocruz, RJ,4–Ipec-Fiocruz, RJ, 5–Densp-Ensp-Fiocruz, RJ.

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) tem se mostrado útil no controle epidemiológico e na redução de casos humanos e caninos. O ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido cada vez mais empregado no diagnóstico sorológico da LVC. Devido à necessidade de melhorar sua qualidade para obtenção de testes mais sensíveis e específicos, novas ferramentas são necessárias. A tecnologia de IgY que utiliza *Gallusgallus* como animal de produção de anticorpos, em substituição aos mamíferos de uso habitual, mostra-se viável do ponto de vista ético e econômico na construção de kits de diagnóstico. Este trabalho teve por objetivo, realizar o isolamento e a purificação da IgY anti-IgG canina a partir de gemas de ovos e sua conjugação com peroxidase de rabanete (HRP) para utilização como anticorpo secundário no ELISA para o diagnóstico da LVC. Para produção de IgY, galinhas poedeiras foram imunizadas com IgG canina purificada, associada a adjuvante de Freund, em três doses. A IgY foi isolada por precipitação com polietilenoglicol e purificada em coluna de afinidade HitrapIlgYpurification. O perfil proteico e eletroforético da IgY isolada e purificada, analisado por espectrofotometria e SDS-PAGE. A especificidade da IgY purificada frente ao antígeno imunizante, aferida por western-blot e ELISA. A conjugação da IgY com HRP realizada após processo de purificação e sua eficiência analisada a partir da titulação do conjugado em diferentes concentrações, utilizando extrato bruto de *L.(L.) infantum* como antígeno, diante de soros reagentes e não reagentes para LVC diluídos 1:100. Para análise dos resultados, foi utilizado teste de Kruskal-wallis com nível de significância de 5%. A média de produção de IgY isolada, após imunização foi de 97,55 mg de IgY/gema sem diferença significativa e sem oscilação durante os meses analisados (Kruskal-wallistest, H= 1.57, p>0.05). O perfil da IgY isolada no SDS-PAGE, evidenciou a cadeia pesada com 68 kDa e a cadeia leve com 27 kDa, com presença de bandas acessórias em pequena quantidade não eliminadas justificando a purificação. A IgY purificada demonstrou alto grau de pureza, com presença de bandas entre 56,2-35,8 kDa, as quais provavelmente correspondem a fragmento precursor da vitelogenina II. A IgY demonstrou reconhecimento no ELISA, frente a IgG canina até a diluição 1:51200 (0,08µg/IgY), utilizando diluição de 1:40959 (0.05µg) de IgG canina, o que comprova o excelente reconhecimento e capacidade de ligação entre as duas imunoglobulinas. No western-blot, frente a IgG canina purificada, a IgY apresentou forte reconhecimento tanto da cadeia pesada como da leve. Da mesma forma, foi capaz de reconhecer IgG proveniente de soro de cão clinicamente saudável, não sendo capaz de reconhecer IgG provenientes de outras espécies animais. A titulação do conjugado, utilizando antígenos em concentrações crescentes (5, 7,5, 10, 20 µg de proteínas/mL) frente aos soros testados, foi reacional até a diluição de 1:4000 diante de todas as concentrações antigênicas. A produção de anticorpos policlonais através da imunização de galinhas demonstrou ser uma excelente alternativa, gerando anticorpos de qualidade e em grande quantidade a partir da gema dos ovos, capaz de reconhecer com efetividade a IgG canina. A conjugação ocorreu sem danos a sua estrutura e a capacidade de reagir frente ao antígeno correspondente, o que demonstra seu excelente potencial como ferramenta a ser utilizada no imunodiagnóstico da LVC.

Apresentador: santosfn.vet@gmail.com
Apoio financeiro: CNPq, Faperj