

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
MPCAL



Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biomodelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Paula Borba Cruz

**Produção de IgY anti - *Campylobacter jejuni* para pesquisa de co-
proantígenos de *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis***

Rio de Janeiro

2017

Paula Borba Cruz

Produção de IgY anti – *Campylobacter jejuni* para pesquisa de coproantígenos de *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ

Orientador: Joseli Maria da Rocha Nogueira

Co-orientador: Fernanda Nunes Santos

Rio de Janeiro

2017

CRUZ, PAULA BÓRBA.

Produção de IgY anti-Campylobacter jejuni para pesquisa de coproantígenos de Macaca mulatta e Macaca fascicularis / PAULA BÓRBA CRUZ. - , 2017.

117 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2017.

Orientadora: JOSELI MARIA DA ROCHA NOGUEIRA.

Co-orientador: FERNANDA NUNES SANTOS.

Bibliografia: f. 90-98

1. ImunoglobulinaY(IgY). 2. Campylobacter jejuni. 3. Macaca fascicularis. 4. Macaca mulatta. 5. Ensaio imunoenzimático (ELISA). I. Título.

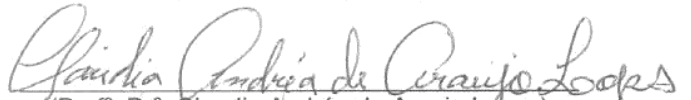
Paula Borba Cruz

Produção de IgY anti - *Campylobacter jejuni* para pesquisa de coproantígenos em amostras fecais de *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Aprovada em 19 de dezembro de 2017

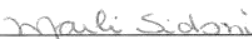
BANCA EXAMINADORA


(Prof^a. Dr^a. Claudia Andréa de Araujo Lopes)

ICTB - FIOCRUZ



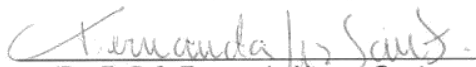
(Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva)
Faculdade de Medicina de Campos - FMC



(Prof^a. Dr^a. Marli Sidoni)
Farmanguinhos - FIOCRUZ


(Prof^a. Dr^a. Joseli Maria da Rocha Nogueira-orientadora)

ENSP-FIOCRUZ



(Prof^a. Dr^a. Fernanda Nunes Santos-orientadora)

ENSP-FIOCRUZ

Dedicatória:

Dedico meu trabalho a todos os animais da primatologia do ICTB - Fiocruz

AGRADECIMENTOS

- À Deus e aos guias que me dão luz para caminhar todos os dias.
- À minha filha Maria pela paciência e pelos beijinhos quando a mamãe estava cansada demais para dar atenção. E a minha família que sempre me incentivou a continuar
- Às minhas orientadoras Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira e Dra. Fernanda Nunes Santos, por passarem todo o processo do mestrado, orientando e incentivando minhas iniciativas e principalmente me ajudando a compor um texto coerente.
- Às minhas “amigas loucas” por todo suporte e por sempre me apoiarem incondicionalmente.
- Aos amigos do DCB-ENSP/Fiocruz em especial a equipe do Laboratório de Imunodiagnóstico, principalmente ao chefe da equipe Dr. Valmir Laurentino Silva que autorizou a realização deste projeto e contribuiu com inúmeras sugestões.
- Ao SCPrim-ICTB/Fiocruz como um todo, por tudo que me ensinaram, principalmente como funciona e a importância da criação de primatas do velho mundo. Ao chefe do setor Fábio Alves da Silva que desde o início reuniu os veterinários Daniel Rouede de Andrade Oliveira, Lynn Barwick Cisne e Ana Cristina Araújo Pinto que prontamente nos ajudaram coletando as amostras do painel e esclareceram muitas dúvidas sobre o manejo dos animais. Quero também agradecer a Natália Francelin Gomes Cordeiro de Lima, responsável pelo setor de registro de dados e que carinhosamente forneceu todos os dados dos animais analisados.
- A Equipe do LATER - Biomanguinhos/Fiocruz, por cederem seu tempo, espaço e dividir seu conhecimento comigo, proporcionando intenso aprendizado na avaliação das proteínas para inoculação, quantificação e purificação tanto do material bacteriano quanto da IgY. Quero agradecer especialmente à Chefe do Laboratório, Gabriela dos Santos Esteves que deu todo suporte e liberação para que suas funcionárias,

Mariana Miguez Tardelli Garcia, Maria Luiza Azevedo, Carolina Lessa Aquino e Ana Carolina Magalhães Andrade de Góes me ajudassem intensamente, viabilizando muitas técnicas, contribuindo com dicas úteis e doação de material para a pesquisa.

- Aos meus queridos amigos do Laboratório de Enterovírus do IOC/Fiocruz, Márcia Leite Baptista e Silas Oliveira, que abriram as portas para a realização de inúmeros testes de SDS-PAGE e Western blot em suas dependências.
- Ao meu compadre Messias da Silva do DATT - IOC/Fiocruz por todo apoio técnico e amizade, sempre nos doando seu tempo e várias substâncias necessárias a realização deste projeto.
- Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas IOC/Fiocruz, principalmente ao Mestre Wagner Esteves Cardoso pelo treinamento em diagnóstico de *Campylobacterioses* e pela realização do diagnóstico clássico de *Campylobacter* spp. por cultivo, nas amostras do painel de fezes e lavados da ampola retal dos primatas não humanos.
- À coleção de *Campylobacter*/CCAMP - IOC/Fiocruz pela cessão da cepa padrão que foram utilizadas para o preparo dos inóculos.
- Ao Mestre Jaime Antônio Abrantes, vinculado ao laboratório de Microbiologia (Lab-Micro) do DCB - ENSP/Fiocruz, que realizou a o isolamento e identificação das bactérias entéricas presentes nas amostras dos primatas não humanos.
- Ao Dr. Eduardo Volotão do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do IOC/Fiocruz por seu auxílio a realização dos protocolos de ultracentrifugação para preparação do antígeno imunizante.
- A equipe do LATED - Biomanguinhos/Fiocruz que realizou a liofilização das frações de IgY do HPLC.
- Ao DSSA - ENSP/Fiocruz, principalmente à coordenadora de laboratório Letícia Alves da Silva que autorizou a utilização de equipamentos e da área laboratorial e as

técnicas Maria Denise Neves Borges e Elizabete Pereira de Figueiredo que me ajudaram com soluções e uso do pHmetro calibrado, realizando as leituras de absorvância a 280nm no espectrofotômetro, que possibilitaram esclarecer muitas dúvidas de HPLC.

- A todos da minha turma, com quem aprendi muito sobre a Ciência em Animais de Laboratório e com quem me diverti muito, para aliviar todo esse processo de stress intenso.
- À todos os componentes do ICTB - Fiocruz, por me ajudarem e me ensinarem o funcionamento de um centro de criação, esclarecendo dúvidas em vários momentos. Agradeço também pela oportunidade de realizar o curso de mestrado em Ciência em Animais de Laboratório, especialmente à coordenação do curso e equipe do ensino, por todo apoio e suporte para esta realização.
- Ao estatístico, Sérgio Alves da Silva da Vice-Diretoria de Gestão da Qualidade do INCQS por todo auxílio no desenvolvimento da avaliação estatística do teste e explicações fundamentais a compreensão.
- As amigas do DCB (Helen, Priscila, Dona Mariza e Dona Antônia) que me proporcionaram momentos de almoços descontraídos principalmente na última fase de escrita quando a pressão aumenta e o estresse também.
- As pessoas da secretaria do DCB que me ajudaram com a impressão e na solução de todos os bugs do meu computador acionando a equipe de informática da ENSP.
- Ao amigo Éder Freire, bibliotecário do ICICT-Fiocruz, por me ajudar a verificar se todas as referências estão contemplando as regras da ABNT e fazer as devidas correções.

“Yes, we can”
Barack Obama

RESUMO

A campilobacteriose é uma das principais doenças entéricas de origem alimentar do mundo. É capaz de ocorrer, não só no homem, mas também em primatas não humanos de cativeiro. Sendo, desta forma, importante no monitoramento sanitário destas colônias. Causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, seu diagnóstico é realizado pela detecção do micro-organismo nas fezes, pelo método padrão ouro: o cultivo microbiológico, incluindo o isolamento, prova de Gram e testes bioquímicos. Todo o processo leva de 5 a 7 dias. Outra forma de diagnóstico são os kits de detecção antigênica por ensaio imunoenzimático que são de fácil realização e o resultado determinado em poucas horas. Entretanto, estes kits utilizam anticorpos produzidos em mamíferos e têm sua eficiência questionada por conta da acurácia reduzida. Sendo assim, esse estudo teve por principal objetivo, produzir Imunoglobulina Y (IgY) como anticorpo primário extraído de gemas de ovos de galinhas imunizadas com *Campylobacter jejuni* para sua aplicação em um teste imunoenzimático *in house*, para pesquisa de coproantígenos de *Campylobacter* sp. em amostras de primatas não humanos do gênero *Macaca*. Sua realização seguiu a política dos 3Rs, já que desenvolve uma técnica onde são utilizados um número menor de animais para produção de IgY, quando comparados aos testes tradicionais, além de promover produção maior com procedimentos menos invasivos. Para isso galinhas poedeiras foram imunizadas com antígeno bruto de *C. jejuni*, foram colhidos ovos para isolamento, caracterização de IgY, purificação e utilização como anticorpo primário no ELISA *in house* frente a amostras de fezes e lavado da ampola retal dos primatas avaliados. Após purificação, a IgY demonstrou perfil eletroforético compatível com o descrito para molécula, apresentou reconhecimento frente ao antígeno imunizante por meio de western-blot e ELISA e foi capaz de detectar bactérias do gênero *Campylobacter* spp. nas amostras fecais do gênero *Macaca*. O teste de ELISA construído utilizando a IgY como anticorpo primário, demonstrou reconhecimento frente ao antígeno imunizante nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Imunoglobulina Y (IgY), *Campylobacter jejuni*, *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*, Ensaio imunoenzimático (ELISA)

ABSTRACT

Campylobacteriosis is one of the world's leading enteral food-borne diseases. It can occur not only in man but also in non-human primate of captivity. Thus, it is important in the sanitary monitoring of these colonies. Caused by *Campylobacter* bacteria, its diagnosis is performed by the detection of the microorganism in the feces, by the gold standard method: microbiological culture, including isolation, Gram test and biochemical tests. The entire process takes 5 to 7 days. Another form of diagnosis is the antigen detection kits by enzyme immunoassay that are easy to perform, and the result determined in a few hours. However, these kits use antibodies produced in mammals and have their efficiency questioned because of the reduced accuracy. Therefore, the main objective of this study was to produce immunoglobulin Y (IgY) as the primary antibody extracted from egg yolks from chickens immunized with *Campylobacter jejuni* for its application in an in-house immunoenzymatic test for *Campylobacter* sp. in samples of non-human primates of the genus *Macaca*. Its accomplishment followed the policy of the 3Rs, since it develops a technique where a smaller number of animals are used for IgY production, when compared to the traditional tests, besides promoting greater production with less invasive procedures. For this, laying hens were immunized with crude *C. jejuni* antigen, eggs were collected for isolation, IgY characterization, purification and use as primary antibody in the in-house ELISA against faecal samples and lavage of the rectal ampulla of the primates evaluated. After purification, IgY demonstrated an electrophoretic profile compatible with that described for the molecule, showed recognition against the immunizing antigen by means of western blot and ELISA and was able to detect bacteria of the genus *Campylobacter* spp. in the fecal samples of the genus *Macaca*. The ELISA test constructed using IgY as the primary antibody, demonstrated recognition against the immunizing antigen in the analyzed samples.

Key words: Immunoglobulin Y (IgY), *Campylobacter jejuni*, *Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1: Comparação estrutural de imunoglobulinas IgG (de mamíferos) e IgY (de aves, répteis e anfíbios).	32
Figura 2: Vantagens da produção e utilização da IgY .	34
Figura 3: Quadro do perfil bioquímico das espécies do gênero <i>Campylobacter</i>	47
Figura 4: Esquema de inoculações da ave	52
Figura 5: Esquema de ELISA indireto.	57
Figura 6: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de <i>C. jejuni</i> após primeiro processo de sonicação para obtenção do extrato bruto proteico. A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder); coluna 1-Padrão de peso molecular, coluna 2-vazio, coluna 3-precipitado diluído 1:10, coluna 4-vazio, coluna 5-precipitado diluído 1:100, coluna 6-vazio, coluna 7-vazio e coluna 8-sobrenadante puro.	66
Figura 7: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de <i>C. jejuni</i> após segundo processo de sonicação para obtenção do extrato bruto proteico. A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder); coluna 1-Padrão de peso molecular, coluna 2-vazio, coluna 3-sobrenadante 1x, coluna 4-vazio, coluna 5- sobrenadante 2x, coluna 6-vazio, coluna 7- sobrenadante 3x.	67
Figura 8: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado e sobrenadante do extrato bruto proteico de <i>C. jejuni</i> após sonicação com material de 20 placas. A direita, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Pre-stained Protein Ladder); coluna 1-precipitado puro, coluna 2- sobrenadante 1x, coluna 3- sobrenadante 2x, coluna 4- Padrão de peso molecular.	67
Figura 9: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de	68

C. jejuni após segundo processo de sonicação utilizando tampão de lise com diferentes concentrações do sobrenadante. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder), Coluna 1- Padrão de peso molecular, coluna 2- sobrenadante 1x, coluna 3- sobrenadante 2x, coluna 4- sobrenadante 3x.

74

74

Figura 10: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de *C. jejuni* após tratamento com detergente. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder), coluna 1- Padrão de peso molecular, coluna 2- sobrenadante não tratado com solução detergente, coluna 3 - vazio, coluna 4- sobrenadante tratado com solução detergente.

75
69

Figura 11: Perfil de produção de IgY após a imunização completa medida por espectrofotometria a 280nm. As barras representam o desvio padrão. Legenda: Colunas mês 1: 18,49 mg/mL; mês 2: 17,73 mg/mL; mês 3: 11,36 mg/mL e mês 4: 7.67 mg/mL .

70

Figura 12: Análise de SDS-PAGE em condições de redução das IgY extraídas utilizando PEG. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder), Coluna 1. IgY Dia de coleta 28; Coluna 2. IgY Dia de coleta 33; Coluna 3. IgY Dia de coleta 36; Coluna 4. Padrão de peso Molecular e Coluna 5. IgY Dia de coleta 44.

71

Figura 13: Análise por Western blot da reatividade IgY extraída anti-*C. jejuni* frente a *Campylobacter jejuni*. Legenda: A esquerda esquema de frações do padrão de peso molecular (kalendoscope-Bio-Rad),coluna 1 - *C.jejuni* cepa ATCC33291; coluna 2 - Padrão de peso molecular.

72

Figura 14: Análise por Western blot da reatividade IgY extraída anti-*C. jejuni* frente a bactérias da microbiota intestinal de PNH e bactérias do gênero *Campylobacter*. Legenda: coluna s: 1. *E. coli* 1 ;2. *E. coli* 2; 3. *Proteus vulgaris*; 4. *Proteus mirabilis*; 5. *Yersinia enterocolitica*; 6. *Enterobacter* sp.; 7. *Campylobacter coli*.

72

Figura 15: Perfil cromatográfico da IgY utilizando adsorção tiofílica acoplado ao sistema de HPLC da primeira passagem de IgY extraída.

Figura 16: Perfil cromatográfico da IgY utilizando adsorção tiofílica acoplado ao sistema de HPLC da segunda passagem de IgY extraída

Figura 17: Perfil cromatográfico da IgY utilizando adsorção tiofílica acoplado ao sistema de HPLC da terceira passagem de IgY extraída

Figura 18: Análise de SDS-PAGE em condições de redução da IgY purificada utilizando PEG. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (BenchMarck protein ladder), coluna 1: IgY purificada, coluna 2: Padrão de Peso Molecular. 76

Figura 19: Análise por Western blot da reatividade IgY extraída anti-*C. jejuni* frente a bactérias da microbiota intestinal de PNH e bactérias do gênero *Campylobacter*. Legenda: A esquerda, esquema das frações de peso molecular (kalendoscope Bio-rad); coluna 1. *E. coli* 1; coluna 2. *E. coli* 2; coluna 3. *Proteus vulgaris*; coluna 4. *Proteus mirabilis*; coluna 5. Padrão de peso molecular; coluna 6. *Yersinia enterocolitica*; coluna 7. *Enterobacter* sp.; coluna 8. *Campylobacter coli*; coluna 9. *Campylobacter jejuni* coluna 10. vazia 78

Figura 20: Quadro de resultado das amostras de Lar na placa 1 no ELISA 80

Figura 21: Quadro de resultado das amostras de Lar na placa 2 no ELISA 82

Figura 22: Quadro de resultado das amostras de fezes no ELISA 84

Figura 23: Gráfico referente ao ELISA com dopagem das amostras de LAR. Na primeira coluna, média da leitura da Bactéria pura lisada, na segunda coluna, média das leituras dos LARs de *Macaca fascicularis* acrescidos de bactéria do controle e na terceira coluna, a média das leituras dos LARs de *Macaca mulatta* acrescidos de bactéria do controle 88

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Desempenho de kits comerciais selecionados para detecção direta de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em amostras de fezes.	40
Tabela 2: Tabela de percentuais para diferenciação bioquímica das principais enterobactérias pesquisadas	49
Tabela 3: <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de amostras do material fecal de <i>Macaca fascicularis</i> em criatório científico.	61
Tabela 4: Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes de <i>Macaca fascicularis</i> de criatório científico.	62
Tabela 5: <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de amostras do material fecal de <i>Macaca mulatta</i> de criatório científico.	63
Tabela 6: Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes de <i>Macaca mulatta</i> em criatório científico.	64
Tabela 7: Leituras em densidade ótica (DO) a 280 nm e concentração de IgY purificada (mg/mL) após as passagens na coluna Hi-Trap® IgY Purification acoplada ao HPLC.	75
Tabela 8: Parâmetros de concordância bruta entre os testes realizados e o resultado do teste padrão ouro	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E TERMOS ESTRANGEIROS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

Ad libitum – A vontade

ATCC - American Type Culture Collection (Coleção Americana de Células Típicas)

3Rs – REDUCTION, REPLACEMENT AND REFINEMENT (Redução, Refinamento e Substituição)

BCA - Ácido bicinchonínico

BHI-Brain heart infusion

CCAC – CANADIAN CONCIL ON ANIMAL CARE (Conselho Canadense de Cuidado Animal)

CCampy-Coleção de *Campylobacter*

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)

CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAB – Diaminobenzidina

DATT - Departamento de Apoio Técnico e Tecnológico

DCB – Departamento de Ciências Biológicas

DO – Densidade Óptica

DSSA – Departamento de Saneamento E Saúde Ambiental.

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

EURL- ECVAM – EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING (Laboratório Referência de Método Alternativos da União Europeia).

Fab – Fragmento de ligação ao antígeno

FBP - solução redutora de oxigênio composta de sulfato ferroso, bissulfito de sódio e piruvato de sódio

Fc – Fragmento cristalizável

FDA - US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Órgão que regula liberação de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos)

FELASA – FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE

ASSOCIATION (Federação da Associação Europeia de Ciência em Animais de Laboratório)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

ICICT - Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnologia em Saúde

IgG - imunoglobulina G

IgY – imunoglobulina Y

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

In house - teste não comercial de desenvolvimento do laboratório de pesquisa

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

LabMicro – Laboratório de microbiologia

LAR - Lavado da ampola retal

LATER – Laboratório de Tecnologia Recombinante

OMPs - OUTER MEMBRANE PROTEINS (proteínas de membrana externa)

OPD - O-Phenylenediamine dihydrochloride (O-fenilenodiamina dicloridrato)

PBS – Tampão salina fosfato

PBS -T– Tampão salina fosfato tween 20

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação da polimerase em cadeia)

PEG - Polietilenoglicol

Pm – Padrão de peso molecular

PNH – Primatas não humanos

SCQA - Serviço de Qualidade Animal

SCPrim –Serviço de Criação de Primatas Não-humanos

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Dodecil sulfato de sódio –Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)

TA - Temperatura Ambiente

TSI – Triple Sugar Iron (meio com três açúcares e ferro)

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (3,3',5,5' tetrametilbenzidina)

USA - United States of America

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

H₂S – Sulfeto de Hidrogênio ou Gás Sulfídrico

KCl – Cloreto de potássio

kDa - Kilodalto

K₂SO₄ – Sulfato de Potássio

μL - microlitro

μg - micrograma

mL- mililitro

mg – miligrama

mM – milimolar

Na₂CO₃ - Carbonato de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

x g – Força g

® Marca registrada

% - Percentual

SUMÁRIO	Pág.
1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1. Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório	29
2.2. Imunoglobulina Y(IgY) e as vantagens de sua metodologia de produção	31
2.3. Gênero <i>Campylobacter</i>	35
2.3.1. Características	35
2.3.2. Campylobacteriose e sua ocorrência em PNH	36
2.4. Métodos de detecção do agente bacteriano	38
2.4.1. Cultura (técnica Padrão ouro)	38
2.4.2. Testes imunoenzimáticos (ELISAs) para detecção de antígenos de <i>Campylobacter</i> sp. disponíveis comercialmente	39
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	42
4.1. Objetivo Geral	42
4.2. Objetivos específicos	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1. Locais de realização das diferentes fases do estudo	43
5.2. Delineamento do estudo	43
5.3. Obtenção das amostras	44
5.3.1. Aspectos éticos	44
5.3.2. Amostras de material fecal (swab retal, LAR e fezes frescos) de primatas não humanos (PNH)	44
5.3.3. Amostras de fezes humanas para controle negativo	45
5.4. Métodos	46
5.4.1. Painel de amostras e sua caracterização microbiológica	46
5.4.1.1. Detecção de <i>Campylobacter</i> spp.	46
5.4.1.2. Detecção de enterobacteriaceae nas amostras dos PNH	48

5.5. Preparação do antígeno imunizante e a inoculação das aves para produção de IgY	50
5.5.1. Parametros de produção do extrato bruto proteico	50
5.5.2. Produção do antígeno imunizante de <i>Campylobacter jejuni</i>	51
5.5.3. Produção e caracterização das imunoglobulinas Y	52
5.5.3.1. Imunização das galinhas poedeiras	52
5.5.3.2. Extração de IgY	53
5.5.3.3. Purificação da IgY utilizando a coluna “Hi-trap IgY purification”	53
5.6. Caracterização, perfil de produção e análise de especificidade frente ao antígenoimunizante	54
5.6.1. Caracterização da IgY anti- <i>C. jejuni</i> por SDS-PAGE	54
5.6.2. Determinação da concentração de IgY anti- <i>C. jejuni</i> após a extração e purificação	54
5.6.3. Verificação da especificidade da IgY	54
5.6.4. Verificação do reconhecimento da especificidade da IgY anti- <i>C. jejuni</i> .	55
5.7. Verificação da capacidade do reconhecimento dos antígenos de <i>C. jejuni</i> pela IgYnas amostras de fezes e de LAR por ELISA indireto	56
5.7.1. Avaliação dos parâmetros para utilização do ELISA com a IgY anti- <i>Campylobacter</i> spp. <i>in house</i>	57
5.7.2. Aplicação das amostras do painel no ELISA contendo a IgY anti- <i>Campylobacter</i> spp. <i>in house</i>	58
5.7.3. Teste de dopagem das amostras de LAR	59
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1. Painel de amostras e sua caracterização	60
6.2. O antígeno imunizante produzido e a inoculaçãodas aves para produção de IgY	65
6.2.1. Parâmetros de produção do extrato bruto proteico	65

6.2.2. Período de inoculação e produção das imunoglobulinas Y	69
6.2.2.1. Acompanhamento clínico da galinha poedeira	69
6.3. Caracterização das IgYs	70
6.3.1. Concentração de IgY anti- <i>C. jejuni</i> obtida após a extração e sua caracterização por SDS-PAGE	70
6.3.2. Especificidade da IgY extraída anti- <i>C. jejuni</i> por Western blot	71
6.3.3. Especificidade da IgY extraída frente ao antígeno imunizante pelo ELISA	73
6.4. Resultados do processo de purificação da IgY e caracterização da IgY purificada	73
6.4.1. Resultados do processo de purificação da IgY utilizando a coluna “Hi-trap IgY purification”	73
6.4.2. Resultados da caracterização por SDS-PAGE da IgY purificada e frações da purificação utilizando a coluna “Hi-trap IgY purification”	76
6.4.3. Verificação da especificidade da IgY purificada anti- <i>C. jejuni</i> por Western blot	77
6.5. Especificidade e a capacidade do reconhecimento dos antígenos de <i>C. jejuni</i> pela IgY nas amostras de fezes e de Lavado da ampola retal por ELISA indireto	78
6.5.1. Avaliação dos parâmetros para utilização do ELISA com a IgY anti- <i>Campylobacter</i> spp. <i>in house</i>	78
6.5.2. Aplicação das amostras do painel no ELISA contendo a IgY anti- <i>Campylobacter</i> spp. purificada <i>in house</i>	80
6.5.3. Relação entre os resultados de microcultivo e do ELISA das amostras do painel	84
7. CONCLUSÕES	88
8. PERSPECTIVAS	89
9. REFERÊNCIAS	90

ANEXOS:

Anexo 1- Bula do fabricante do meio de cultura utilizado para <i>Campylobacter</i>.	99
Anexo 2 – certificado de treinamento para manipulação do <i>Campylobacter</i> sp.	102
Anexo 3 -Eletroforese SDS-PAGE	103
Anexo 4 -Protocolo para revelação de bandas em gel de Poliacrilamida	104
Anexo 5 - Licença CEUA	105
Anexo 6-Protocolo Hi-trap fabricante	106
Anexo 7 – Protocolo de transferência e Western blot	118

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Campylobacter* estão entre as principais causas de doença diarreica em todo mundo. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, causam mais casos de diarreia alimentar que a *Salmonella* (WHO, 2011). A campilobacteriose é considerada uma zoonose, pois acomete o homem após ingestão de carnes de aves, bovinos e caprinos contaminadas. Nos animais, a infecção pode passar despercebida devido a poucos sintomas (PIELSTICKER *et al.*, 2012). Nos humanos, normalmente, é autolimitada e relativamente de curta duração, entretanto, em alguns casos, os sintomas podem ser graves, implicando em atenção à saúde e impacto econômico considerável (CDC, 2014), podendo inclusive deixar sequelas, neuropatias e desencadear doenças como a síndrome de Guillain-Barré (TOLJANDER *et al.*, 2012). Nos países em desenvolvimento, as infecções por *Campylobacter* em crianças com idade inferior a dois anos são especialmente frequentes, podendo resultar em óbito (WHO, 2011).

A infecção em animais pode ser sintomática ou assintomática. Geralmente, é assintomática em aves, principalmente nos frangos. O que gera grande preocupação, pois pode provocar surtos comprovados pela detecção das bactérias nas carcaças de frango de corte (ALVES *et al.*, 2017). Nos mamíferos, principalmente em primatas, pode causar desde enterites leves até a morte por desidratação causada pela diarreia. Nos primatas não humanos (PNH) do gênero *Macaca* já foram relatados casos de aborto, mortes por encefalites e septicemia, com detecção bacteriana em vários órgãos durante a necropsia (BAILEY; COE, 1999; BAZE; BERNACKY, 2002; CLEMMONS *et al.*, 2014).

A campilobacteriose, também é uma preocupação nos PNH criados em cativeiro. Estes animais podem, muitas vezes pertencer a institutos de pesquisa onde são destinados a utilização como biomodelos. Entretanto, para a aplicação destes animais em estudos biomédicos de doenças e medicamentos, estes devem apresentar bom histórico sanitário, o que vai garantir a confiabilidade dos dados obtidos na experimentação (SAISSE *et al.*, 2010).

Estudos anteriores indicaram várias espécies do gênero *Macaca* como suscetível ao *Campylobacter* spp. (CYSNE, 2007; LAURIA-FILGUEIRAS, 2000; LAURIA-FILGUEIRAS; HOFER, 1998), tornando-se então, importante o monitoramento deste agente, já que sua presença pode ser um possível indicador de determinação do status sanitário da colônia (FELASA, 1999). Este controle é realizado no ICTB (Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - Fiocruz), de acordo com o protocolo de controle sanitário do Serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim), onde são coletadas amostras biológicas em período pré-estabelecido segundo norma da FELASA, para realização de exames laboratoriais processadas no Serviço de Controle de Qualidade Animal (SCQA) durante o monitoramento das condições sanitárias dos animais deste instituto (SAISSE *et al.*, 2010).

Para realizar o acompanhamento do status sanitário PNH em relação a campilobacteriose, o diagnóstico disponível é o mesmo aplicado ao homem. A detecção do micro-organismo através de cultura de fezes em meios e condições específicas de micro-aerofilia e incubação, seguidos de coloração de Gram e provas bioquímicas determinadas para a identificação do agente bacteriano (técnica padrão ouro). Tal metodologia leva de 5 a 7 dias (LAURIA-FILGUEIRAS, 2000) para sua realização. O sucesso na cultura desses patógenos sensíveis requer as amostras de fezes o mais frescas possíveis e o transporte refrigerado em distâncias curtas, pois o micro-organismo possui sensibilidade ao oxigênio (BRASIL, 2011).

Outra possibilidade é a utilização de técnicas moleculares para a detecção de fragmentos específicos do DNA bacteriano, mas que ainda exigem uma condição laboratorial nem sempre possível, devido ao alto custo de implantação, manutenção e ao espaço adequado as necessidades da técnica (KALASHNIKOVA *et al.*, 2006; VILARDO *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007).

Comercialmente, estão disponíveis também testes de detecção sorológica, contudo, além destes não terem indicação para uso em amostras de animais não humanos,

utilizam anticorpos cuja produção necessita de maior quantidade de animais e ocorre a partir de coletas de grande volume de sangue, o que causa sofrimento e injúrias sistêmicas passíveis de irreversibilidade (SCHADE *et al.*, 1996). Portanto, tais testes podem ser refinados buscando atender as recomendações dos princípios dos 3Rs (FLECKNELL, 2002).

Ao avaliar os testes imunoenzimáticos disponíveis no mercado, Bessède e colaboradores (2011), assim como Oyarzabal e Battie (2012), puderam observar que o principal kit de diagnóstico utilizado em vários trabalhos não demonstrou a reprodutibilidade indicada pelos fabricantes, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de um novo teste imunoenzimático para *Campylobacter* sp. com resultados mais confiáveis e que siga a recomendação do órgão de validação de métodos alternativos europeu (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL-ECVAM), atendendo também ao princípio dos 3R para a produção de anticorpos (SCHADE *et al.*, 1996).

Em consonância com essas recomendações, já está estabelecido que a produção de anticorpos por galinhas poedeiras, constitui refinamento da técnica e reduz o uso de animais de laboratório. O refinamento, ocorre com a substituição da sangria (método doloroso), pela coleta de ovos, de onde serão retiradas as gemas para isolamento de anticorpos de interesse, sem causar nenhuma injúria animal. A redução se dá pela possibilidade de com a utilização de uma única galinha produzir inúmeros ovos (SCHADE *et al.*, 1996), cujas gemas são reconhecidas como uma excelente fonte de anticorpos. Outra vantagem frente a produção convencional é a possibilidade de produzir anticorpos mais específicos contra antígenos de mamíferos, em função da distância filogenética (KRIEF *et al.*, 2002). Esta metodologia não só reduz os problemas éticos de produção dos anticorpos, mas também apresenta vantagens econômicas, já que ocorre por um longo tempo e gera grande quantidade de IgY durante todo período de postura das aves, por aproximadamente 2 anos (PAULY *et al.*, 2009). Aliada as vantagens econômicas, há também muitas vantagens operacionais, como: a faixa etária ampla dos animais utilizados assim como o manejo em condições laboratoriais, bem simples e custo de manutenção inferior ao dos

mamíferos, principalmente os de grande porte, tornando essa alternativa bastante relevante (POLSON *et al.*, 1980).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório

A defesa dos animais de laboratório é uma causa bem antiga. Em 1760, Fergusson já se mostrava preocupado com os “métodos bárbaros” utilizados em teste com animais. No século XIX, Jeremy Bentham lançou uma máxima a ser considerada: “A questão não é se os animais raciocinam, ou se eles podem falar, mas se eles sofrem.” Neste mesmo século, houve uma primeira tentativa de propor um código de ética para que a dor imposta aos animais na pesquisa fosse diminuída. Essa proposta, sugerida por Marshal Hall além de indicar a substituição dos animais de grande porte por animais inferiores na escala zoológica, recomendava que fosse evitada as repetições desnecessárias para obtenção de resultados. A partir destas idéias, foi fundada em 1842 a Sociedade Britânica para prevenção da crueldade aos animais (British Society for the Prevention of Cruelty to Animals), mais tarde chamada de Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (PRESGRAVE, 2002).

Em 1959, William Russel & Rex Brunch publicaram um texto aprofundando e esclarecendo muitos pontos da proposta de Hall, com os princípios dos 3Rs (“Replace, Reduce and Refinement” - Substituição, redução e refinamento). A substituição consiste na aplicação de metodologias experimentais que não usam animais sencientes no lugar daquelas que os utilizam. Como por exemplo, a infecção em cultura celular ou em chips que simulem a fisiologia de um ou mais órgãos (“human on a chip”). Outro exemplo é o uso de modelos computacionais que ajudem a prever interações fisiológicas de novas substâncias. Já as definições de refinamento e redução estão interligadas, pois o refinamento consiste em melhorias metodológicas que proporcionem a redução do número de animais utilizados na experimentação animal e na diminuição da dor e sofrimento causados a estes animais. Isto irá reduzir também os interferentes causadores de variações nos resultado,

tornando os resultados dos experimentos estatisticamente significativos. Um exemplo é a utilização de anestesia que, além de minimizar o sofrimento, reduz a interferência nos resultados das pesquisas. Melhorias no manejo do animal também levam a redução de interferentes como, por exemplo, o estresse, atingindo o mesmo propósito de reduzir o número de animais utilizados, uma vez que reduz a necessidade de repetir o experimento. Outra redução possível, está na possibilidade, de pela melhoria das técnicas, congelar embriões de animais de laboratório, que passam a ser produzidos de acordo com a necessidade experimental sem excessos, contemplando a filosofia dos 3Rs (RUSSELL; BURCH, 1959).

O princípio dos 3Rs foi um marco para mudanças na legislação inglesa, preconizando o controle do uso de animais de experimentação (FLECKNELL, 2002). Desde então a sociedade europeia despertou para a questão da valorização dos seres vivos de um modo geral, inclusive a vida do homem. Por esta razão nos anos 60 até o início dos anos 70 se estabeleceu buscar por metodologias alternativas para substituir os identificadores de moléculas biológicas marcadas com moléculas radioativas, levando Engvall e Perlmann em 1971, a desenvolver o ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas (ELISA ou EIA) (OYARZABAL; BATTIE, 2012).

Segundo OYARZABAL; BATTIE (2012), KÖHLER; C. MILSTEIN desenvolveram a técnica de hibridoma que possibilitou a síntese de anticorpos monoclonais, em 1975, e com isso a facilitou a expansão do imunodiagnóstico e o desenvolvimento de imunoenaios para a identificação de micro-organismo. O passo seguinte foi o surgimento de uma variedade de ensaios imunológicos para detecção de diferentes agentes patogênicos de origem alimentar em amostras de alimentos e de fezes, incluindo alguns para detecção de *Campylobacter* sp. (OYARZABAL; BATTIE, 2012).

Neste momento, surge o conceito de métodos alternativos de Smyth (1978) “Todos os procedimentos que podem substituir completamente a necessidade de experiências com animais, reduzir o número de animais necessários, ou diminuir a intensidade de dor ou angústia sofrida pelos animais em atender as necessidades essenciais do homem e outros animais” (FLECKNELL, 2002). Atualmente, o conceito de métodos alternativos é

mais amplo, sendo considerados procedimentos que podem substituir o uso de animais em experimentos, reduzir o número de animais necessários, ou refinar a metodologia de forma a diminuir a dor ou o desconforto sofrido pelos animais (PRESGRAVE, 2002). As possibilidades de substituição dos animais pode ser de variadas formas como por exemplo: pelo uso de informações obtidas no passado, pelo uso de técnicas físico-químicas, uso de modelos matemáticos ou computacionais, pelo uso de organismos inferiores não classificados como animais protegidos, pelo uso de estágios iniciais do desenvolvimento de espécies animais protegidas, pelo uso de sistemas *in vitro*, vigilância pós-mercado e estudos epidemiológicos e pelo uso de voluntários humanos (PRESGRAVE, 2002).

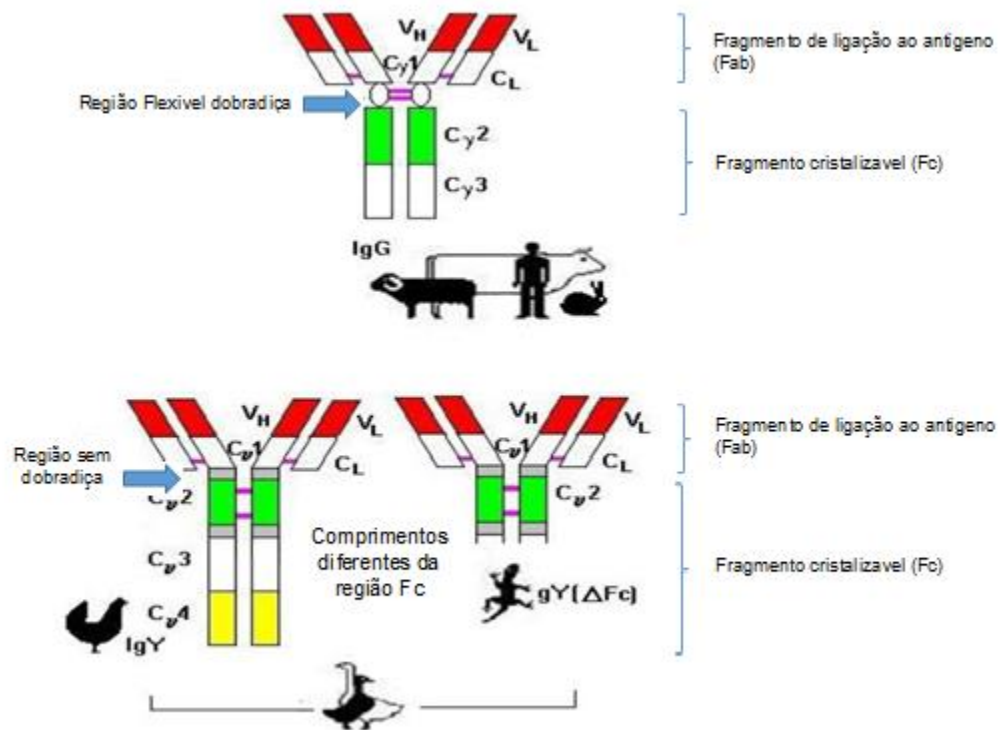
Dentro deste conceito, surge a tecnologia da produção e isolamento da imunoglobulina Y (POLSON *et al.*, 1985; POLSON *et al.*, 1980), podendo esta prática ser considerada como um método alternativo à produção de imunoglobulinas para os testes diagnósticos. Tal metodologia substitui o animal utilizado, sendo uma técnica mais refinada, e que necessita de menos animais para a produção, minimizando dor ou estresse aos animais na produção de anticorpos. Por esta razão esse procedimento é recomendado pelos órgãos de validação dos métodos alternativos como o ECVAM (na Europa (TAYLOR *et al.*, 2014; SCHADE *et al.*, 1996) e o CCAC (*Canadian Concil on Animal Care*) na América do norte (CCAC, 2002).

2.2. Imunoglobulina Y (IgY) e as vantagens de sua metodologia de produção

As IgYs são imunoglobulinas séricas encontradas de aves, répteis e anfíbios. São transferidas do soro para a gema do ovo, onde se concentra para conferir imunidade passiva aos seus embriões (BARDOS, 2011). As gemas dos ovos das aves, principalmente das galinhas constituem uma fonte rica em anticorpos. Após a imunização das galinhas, os ovos após a postura, conterão grande quantidade de IgY contra o antígeno imunizante (LARSSON *et al.*, 1993).

As imunoglobulinas são, em geral, compostas de cadeia leve e cadeia pesada.

Ambas possuem regiões constantes (C_y) e variáveis (V). A IgY é semelhante a imunoglobulina G (IgG) composta por duas cadeias leves (~25kDa cada) e duas cadeias pesadas (~70kDa cada). A IgG, como demonstra a Figura 1, possui duas cadeias pesadas cada uma com três domínios constantes e um domínio variável. Além disso, possui duas cadeias leves, cada uma com um domínio constante e outro domínio variável. Possui também uma região central (Região Flexível) com duas ligações de bissulfeto que confere extrema flexibilidade a essa região. A IgY tem a região central rígida (sem flexibilidade) e as duas cadeias pesadas com quatro domínios constantes no caso das aves. Para os répteis e anfíbios, possuem só dois domínios constantes (Figura 1) (MINE, 2008; BARDOS, 2011).



Fonte: BARDOS, 2011

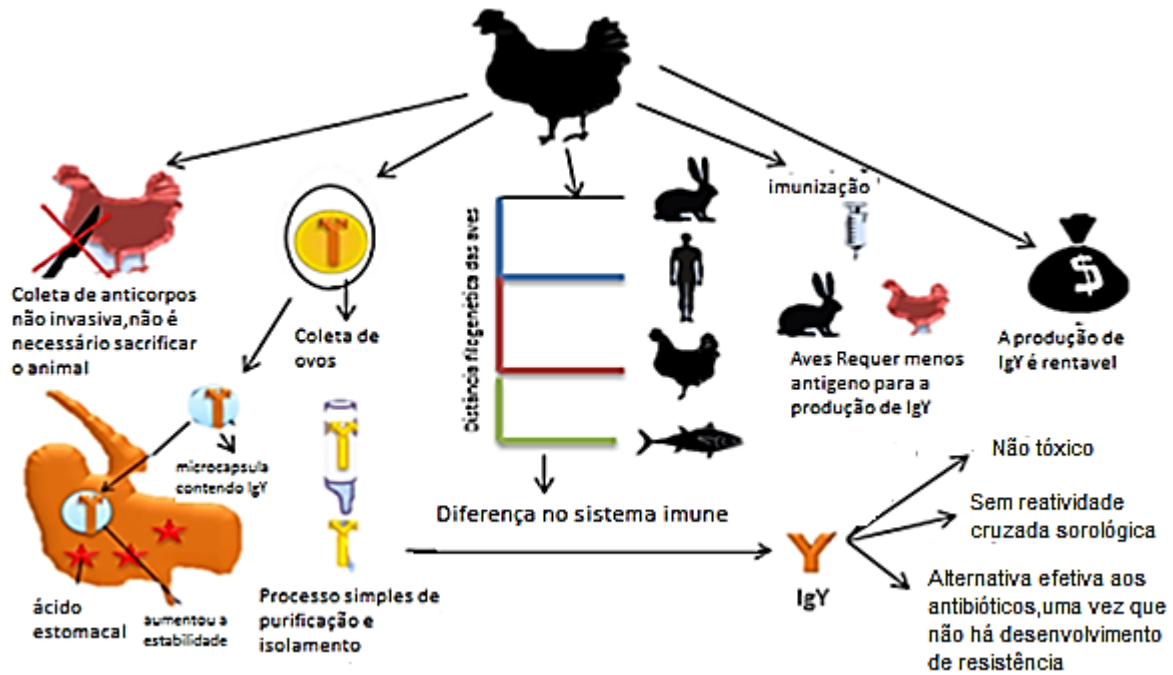
Figura 1 : Comparação estrutural de imunoglobulinas IgG (de mamíferos) e IgY (de aves, répteis e anfíbios).

A IgY de aves não tem sua atividade afetada em decorrência do congelamento e descongelamento demonstrando boa estabilidade (HEGEMANN; PARDAL; MATSON,

2017). Um ovo após a postura pode ser estocado a 4°C por 6 meses sem que a IgY sofra perda de atividade biológica, e, a -20°C pode permanecer por 12 meses. A estabilidade da IgY também se apresenta em ampla faixa de pH. Para pH ácido, só inicia a perda da atividade quando o valor é inferior a 3, e com relação a faixa de pH básico, a atividade se reduz apenas em valores superiores a 12 (SANTOS, 2012).

Muitas podem ser as vantagens na utilização da IgY (Figura 2), já que possuem baixo custo de produção e poucos animais são necessários para sua obtenção em escala de miligramas, permitindo o uso de estruturas laboratoriais mais simples e menores. Além disso, após o estímulo pela vacinação com o antígeno, a imunoglobulina é liberada na gema dos ovos, o que permite a obtenção e purificação dos anticorpos sem necessidade de utilizar métodos que causam dor e sofrimento ao animal, fato que ocorre na produção de anticorpos em outros animais de laboratório (SCHADE *et al.*, 1996). Ou seja, a metodologia de produção da IgY atende aos princípios da política dos 3Rs.

Um outro fator que estimula o uso da IgY na pesquisa científica é a distância filogenética das aves para os mamíferos, minimizando as reações cruzadas nos testes sorológicos, já que não se liga a receptores Fc (de função constante) em mamíferos, não reage com o sistema complemento, não se liga ao fator reumatóide e não reage com proteína G de estreptococos e proteína A de estafilococos (SANTOS, 2012).



Fonte: Adaptado de ZORRIEHZAH *et al.*, 2016.

Figura 2: Vantagens da produção e utilização da IgY

A partir da determinação da União Européia de proibir que animais de criação e granja recebam antibióticos e pela validação da ECVAM (SCHADE *et al.*, 1996) da metodologia de produção de IgY como método alternativo e a possibilidade do seu uso na imunização passiva como substituição ao uso dos antibióticos, vem estimulando a sua utilização colocando como metodologia promissora de produção de anticorpos. Outra utilização, que surgiu nos últimos anos, foi na medicina veterinária, no controle e tratamento de diarreias bacterianas (CHALGHOUMI *et al.*, 2009; DIRAVIYAM *et al.*, 2014; ZORRIEHZAH *et al.*, 2016; THU *et al.*, 2017). Hermans e colaboradores (2014) afirmam que a imunização passiva reduz a colonização e transmissão de *Campylobacter jejuni* em frangos de granja.

A legislação da união europeia, proíbe o uso de animais para fins científicos totalmente em situações como o teste de cosmético e intitui o suporte ao uso de métodos alternativos pela ECVAM (DIRECTIVA 2010/63/UE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, 2010 pag.176). Já legislação brasileira (lei 11794 de 2008 (BRASIL, 2008)) ainda não institui proibições, mas restringe o uso de animais de

laboratório e recomenda a avaliação dos projetos científicos pelo comitê de ética de uso de animais (CEUA) da instituição de pesquisa onde o mesmo será executado. Este comitê deverá ser credenciado pelo CONCEA (Conselho nacional de controle de experimentação animal - Órgão que estabelece normativas reguladoras para uso de animais de laboratório em pesquisa).

2.3. Genêro *Campylobacter*

2.3.1. Características

As bactérias do gênero *Campylobacter* são morfo-tintorialmente bastonetes Gram negativos, encurvados, em forma espiralada ou de "S", que não esporulam e medem 0,2 a 0,5 µm de diâmetro de largura e 0,5 a 5,0 µm de comprimento; podem se apresentar com formas cocóides nos cultivos antigos e geralmente são móveis graças a um flagelo localizado em uma ou nas duas extremidades da célula (BERGEY; HOLT, 2000; LAURIA-FILGUEIRAS, 2000). São quimiorganotróficos, têm metabolismo respiratório; são incapazes de utilizar açúcares (nem oxidação nem fermentação); apresentam na sua bioquímica de identificação a prova citocromo oxidase positiva; produção da enzima catalase variável; não hidrolisam a gelatina nem a uréia (com exceção às linhagens atípicas do *Campylobacter lari* e linhagens do *Campylobacter sputorum* biovar Paraureolyticus) e são desprovidos de lipase (ESTEVES *et al.*, 2011).

Este gênero foi proposto em 1963 por Sebald e Véron para uma bactéria conhecida pelo nome de "*Vibrio fetus*". Na década de 70, incluíram no gênero *Campylobacter* novas espécies e, em função de suas características fenotípicas, elas foram repartidas em 3 grupos: os que produzem a enzima catalase e não produzem H₂S (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*); os que produzem a enzima catalase e produzem H₂S (*C. coli* e *C. jejuni*) e os que não possuíam a enzima catalase (*Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus* e *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum*) (VERON; CHATELAIN, 1973). Atualmente, esse gênero conta com trinta e duas espécies

e 13 subespécies. O reconhecimento nos últimos anos de algumas espécies como patógenos humanos, reforçou também a sua importância na medicina veterinária, já que alguns são reconhecidamente agentes de importantes zoonoses (doenças transmitidas naturalmente de animais vertebrados ao homem e vice-versa) como *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus*. Estudos em modelos animais têm ajudado a elucidar alguns dos mecanismos patogênicos desses agentes, especialmente quanto aos fatores de virulência (ON *et al.*, 1998).

As bactérias *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são as principais espécies patogênicas para primatas. A infecção por *C. jejuni*, geralmente é mais agressiva do que é causada pela *C. coli*. Como as demais bactérias Gram negativas, o *Campylobacter* possui várias proteínas capazes de estimular o sistema imune principalmente a “Outer membrane proteins” (OMPs-que são lipoproteínas presentes em grande quantidade) e a Flagelina (principal proteína de flagelo). No *C. jejuni* predomina a flagelina A e no *C. coli* predomina a flagelina B. A detecção destas pela PCR permite a identificação da espécie (LOGAN; HARRIS; TRUST, 1987).

Segundo Fernando e colaboradores (2008) é possível verificar na sequência de aminoácidos correspondentes a peptídeos das proteínas solúveis de *Campylobacter jejuni* (fragmentos da flagelina A, principalmente os fragmentos P8 (aas:176-205), P16 (aas:376-405), P21 (aas:501-530) e P22 (aas:526-555)) que demonstram ser ótimos imunógenos, funcionando como moléculas estimuladoras de células que produzem anticorpos. Tais fatos corroboram para a utilização do antígeno bruto de proteínas solúveis como estimulador para a produção de anticorpos.

2.3.2. Campylobacteriose e a sua ocorrência em PNH

A campilobacteriose foi descrita como doença no século XIX, entretanto, só foi reconhecida como zoonose e estudada em detalhe a partir da década de 1970. A doença tem distribuição mundial e pode causar, desde diarreias autolimitadas até graves enterocolites (ACHA; SZYFRES, 2005). Em humanos, já foi identificado como causador da sín-

drome de Guillain-Barré e também como causador de septicemias fatais, sendo considerada pela OMS e pelo CDC como uma das principais doenças diarreicas do mundo (CDC, 2014; WHO, 2011).

Em alguns animais há o desenvolvimento da doença, geralmente com sintomas diarreicos, todavia outros pode portar o micro-organismo de forma assintomática (PIELSTICKER *et al.*, 2012). A doença foi detectada e descrita pela primeira vez em animais de laboratório em 1982 por Fox e colaboradores (1982). O mecanismo de virulência primária utilizada pelo *Campylobacter* sp. para produzir colite ainda é obscuro. No entanto, já é reconhecida a participação de enterotoxinas e citocinas no processo de “invasão” bacteriana no organismo (WASSENAAR, 1997). A partir do final da década de 1980 e início da década de 1990 surgiram os primeiros relatos de infecção de animais do gênero *Macaca* com *Campylobacter jejuni* (RUSSELL *et al.*, 1989). E foi descrita no mundo e no Brasil a susceptibilidade das espécies do gênero *Macaca*, de criatórios científicos, destinadas ao uso como biomodelos em diferentes localidades, à bactéria *Campylobacter jejuni* (LAURIA-FILGUEIRAS, 2000; CYSNE, 2007; CLEMMONS *et al.*, 2014).

Paul-Murphy (1993) fez a primeira correlação de casos de enterocolites geradas por infecções bacterianas em *Macaca mulatta*. Estudos seguintes demonstraram que as enterocolites recorrentes causadas por *Campylobacter* spp. foram confirmadas como a principal causa de morbidade em colônias de PNH mantidos em cativeiro (SESTAK *et al.*, 2003). Estas colônias de cativeiro, na sua maioria se concentram em centros pesquisa e são criações de PNH para uso como biomodelos.

Em função dos relatos da doença em animais de cativeiro, foi reforçada a necessidade da pesquisa destes agentes e acompanhamento do “status” sanitário dos animais mantidos em instalações de criação, através de avaliações clínicas e microbiológicas periódicas (ANDRADE, 2002), de forma a viabilizar a experimentação científica com estes animais, já que tais infecções também podem interferir no desenvolvimento das pesquisas, gerando resultados duvidosos.

Com as análises periódicas do “status” sanitário é possível verificar se os animais infectados da colônia são fonte potencial de contaminação para os animais saudáveis e

seus tratadores, que fazem o manejo e tem contato direto (SASSEVILLE; DITERS, 2008). DASSANAYAKE e colaboradores (2005) observaram em seus registros que animais da espécie *Macaca mulatta*, podem desenvolver a forma grave da doença, inclusive com septicemia. Os filhotes desmamados com menos de seis meses, são mais susceptíveis a desenvolver a campilobacteriose de forma grave e geralmente evoluem a óbito (BAZE; BERNACKY, 2002; KALASHNIKOVA *et al.*, 2006).

2.4. Métodos de detecção do agente bacteriano

A detecção de *Campylobacter* sp. em amostras de alimentos e fezes pode ser realizada por diversas metodologias: o microcultivo (método padrão ouro), ensaios imunoenzimáticos (kits comerciais) e por técnicas de biologia molecular (detecção de sequencias conservadas de *Campylobacter* spp).

Os métodos moleculares, apesar de eficientes (MEDEIROS *et al.*, 2014), ainda são bastante custosos, e necessitam de um laboratório adaptado para essa metodologia. Ghosh e colaboradores (2014), apesar de indicarem as técnicas moleculares para detecção de *Campylobacter*, apontam para o ensaio imunoenzimático como uma alternativa de técnica com excelente precisão, ressaltando sua aplicabilidade em laboratórios com poucos recursos. Nos seus estudos de detecção, a PCR apresentou a maior sensibilidade (96,69%), mas seu valor preditivo positivo (85,40%) foi o mais baixo. O ELISA foi capaz de detectar o antígeno de *Campylobacter* em 114 amostras de fezes e, portanto, apresentou alta sensibilidade (94,21%). Em contrapartida, a coloração de Gram juntamente com a cultura (Técnica Padrão Ouro) teve 100% de valor preditivo positivo (a probabilidade do individuo estar realmente com a infecção quando o resultado do teste é positivo).

2.4.1. Cultura (Técnica Padrão Ouro)

A detecção de *Campylobacter* sp. em amostras alimentares e fezes, pelo método clássico, preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), consiste na cultura destas bactérias a partir do material para análise, em meio ágar seletivo, à 42°C e atmosfera com oxigênio reduzido pela passivação do cobre, seguida de posterior confirmação pelo método de Gram e provas bioquímicas (ESTEVES *et al.*, 2011). Neste processo há inúmeras limitações, principalmente a necessidade de 4 a 5 dias para o crescimento e identificação, todavia é o método onde se observa melhor especificidade e valor preditivo positivo (GHOSH *et al.*, 2014).

2.4.2. Testes imunoenzimáticos (ELISAs) para detecção de antígenos de *Campylobacter* sp. disponíveis comercialmente

A literatura demonstra que várias proteínas de *Campylobacter* possuem ação imunogênica o que favorece a produção de ensaios para o diagnóstico de agentes causadores da doença (FERNANDO *et al.*, 2008; BESSÈDE *et al.*, 2011; RADOMSKA *et al.*, 2016). Os imunoenaios podem tornar mais célere a detecção da infecção, devido a redução do tempo de execução do teste em relação à cultura, além de diminuir o custo e simplificar a técnica quando comparado aos métodos moleculares. Com base nesse fato, já existem inúmeros kits comerciais, que utilizam anticorpos de captura, porém esses kits, além de utilizarem técnicas que necessitam de um maior número de animais para a produção de anticorpos, e usar métodos invasivos para obtenção, possuem problemas de acurácia por apresentar resultados falsos positivos e negativos conforme demonstra a tabela abaixo (Tabela 1) (OYARZABAL; BATTIE, 2012).

Tabela 1: Desempenho de kits comerciais selecionados para detecção direta de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de fezes.

Nome do teste	Tamanho da amostra (% Positivo)	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
ProSpec TM <i>Campylobacter</i>	1049	100 (97-100)	99(98-100)	-	-
Microplate (Remel, Lenexa, KS)	164	96 (87-99)	99 (95-100)	9	98
	30%				
	78	80 (62-91)	100 (93-100)	100	89
	38%				
	631	89 (67-97)	99 (98-100)	80	99
	3%				
	1205	89 (82-94)	98 (97-99)	78	99
	8.40%				
	182	95 (88-98)	94 (84-98)	96	91
	34%				
	485	99	96	90	99.7
ImmunoCard (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH)	420	98 (90-100)	95.9 (93-98)	-	-
	485	98	94	89.4	99.7
	242	90			70
	(9.5%)				
Premier CAMPY EIA (Meridian Bioscience)	2073	97 (89-99)	96	-	-
	485	99.2	96	90	99.7
	6%				
	242	90-95		≈80	
	9.50%				
RIDASCREEN® (R Biopharm, Darmstadt, Germany)	259	100	99.6	93	100
	1050	69	87	36	97
	9.30%				
	242	90		≈89	
	9.50%				

Fonte: Traduzido de OYARZABAL; BATTIE, 2012

Os testes comerciais, que utilizam IgG, que são aprovados e liberados pela US Food and Drug Administration (FDA) tem custo elevado inviabilizando muitas vezes a sua aplicação. Um exemplo é o teste da ProSpecT (Prospect *Campylobacter* Microplate Assay) que apesar de ser considerado um dos melhores com 96% sensibilidade e 99% de especificidade, tem um custo de U\$1500,00 para 48 testes (Alexon-trend-latex oxid® dryspot). Embora este teste, segundo Dediste e colaboradores (2003), tenha sido recomendado para amostras de fezes, apresentando maior acurácia que os ensaios de biologia molecular (BESSÈDE et al., 2011; DEDISTE et al., 2003), vários trabalhos utilizando o kit não corroboraram com os resultados indicados pelo fabricante (OYARZABAL; BATTIE, 2012). Além disso, antes de detectar o antígeno, a amostra deve passar por um meio de enriquecimento ou processo de filtração, o que eleva o tempo de detecção a patamares próximos aos da cultura clássica (BESSÈDE et al., 2011).

Portanto, a produção de imunoglobulina Y para desenvolvimento de kit imunodiagnóstico de detecção de *Campylobacter* sp. pode, além de seguir o princípio dos 3Rs, ser vantajosa em relação ao tempo e ao custo quando comparada a metodologias como cultura e às técnicas moleculares, melhorando também a acurácia em razão de algumas vantagens imunológicas que incluem: a IgY não se ligar a receptores Fc de mamíferos, não ativar o sistema complemento, não se ligar ao fator reumatoide, não reagir com proteína G de estreptococos e nem com a proteína A de estafilococos, além de apresentar distância filogenética das imunoglobulinas produzidas em mamíferos, já que é produzida em galinhas, desta forma levando à redução das reações cruzadas entre antígeno-anticorpo (SCHADE et al., 1996 , 2005).

3. JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica pela necessidade de um método de diagnóstico rápido e simples que possibilite acompanhar o status sanitário de uma colônia de PNH mantido em um criatório científico. Além da possibilidade de aplicar uma metodologia que utilize anticorpos produzidos através de um método refinado: a produção dos anticorpos a partir da

extração das gemas de ovos de aves imunizadas, que se enquadra no princípio dos 3Rs de William Russel & Rex Brunch (1959) (FLECKNELL, 2002).

A utilização de IgY pode gerar um ensaio de maior acurácia, quando comparado aos imunoenaios que utilizam imunoglobulinas de mamíferos para o diagnóstico das campilobacterioses. Outras vantagens são, a redução do tempo para o diagnóstico final desta doença em PNH, quando comparado ao padrão ouro que é o cultivo (LAURIA-FILGUEIRAS, 2000), e o menor custo, quando comparado com as técnicas moleculares (MEDEIROS, 2014).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Produzir a IgY anti - *Campylobacter jejuni* e avaliar a capacidade de reconhecer coproantígenos em amostras fecais de *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis* utilizando ELISA “*in house*”.

4.2. Objetivos Específicos

- Construir um painel de amostras fecais e LAR provenientes de PNH do SCprim-ICTB/Fiocruz.
- Avaliar a ocorrência da microbiota intestinal e patógenos presentes nas amostras fecais e LAR
- Cultivar uma cepa padrão de *C. jejuni* (ATCC 33291) para extração de antígenos imunizantes.
- Imunizar a galinha poedeira com o antígeno imunizante de *Campylobacter jejuni* para

obtenção de IgY específica anti-*Campylobacter*.

- Isolar, purificar e caracterizar físico-química e biologicamente IgY.
- Desenvolver um teste imunoenzimático indireto para verificar a capacidade de reconhecimento da IgY específica para *C. jejuni* empregando o painel de amostras fecais e LAR de PNH

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Locais de realização das diferentes fases do estudo

As amostras de fezes e de lavado da ampola retal (LAR) foram coletadas no Serviço de Criação de Primatas não humanos-SCPrim do ICTB/Fiocruz, posteriormente a caracterização microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas - ENSP/Fiocruz, sendo que a detecção específica de *Campylobacter* spp. foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas – IOC/Fiocruz. O processo de produção do antígeno vacinal foi realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante – Biomanguinhos/Fiocruz e a sua purificação foi realizada com apoio do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – Biomanguinhos/Fiocruz. As dosagens proteicas por espectrofotometria foram realizadas no Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental ENSP/Fiocruz. A produção de IgY, o desenvolvimento do teste e sua aplicação nas amostras foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Ciências Biológicas - ENSP/Fiocruz.

5.2. Delineamento do estudo

A partir da produção de IgY proveniente de gemas de ovos de aves imunizadas com extrato bruto proteico de *Campylobacter jejuni*, foi realizada a avaliação dos parâmetros da sua produção e da sua especificidade frente ao antígeno imunizante. Verificou-se

a capacidade de reconhecimento do antígeno nas amostras do painel composto de fezes frescas e LAR (caracterizadas por análises bacteriológicas da microbiota intestinal de PNH do ICTB/Fiocruz) através da técnica de ELISA indireto. Este estudo foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética da Fiocruz e recebeu a licença LW16/17.

5.3. Obtenção das Amostras

5.3.1. Aspectos éticos

As amostras de fezes, LAR e swab retal de PNH adultos (a partir de 2 ano de vida), foram coletadas pela equipe do setor de criação durante o manejo médico anual realizado no período de Abril a Julho de 2016 (Comissão de ética no uso animal - CEUA -Fiocruz - licença LW 5/16).

5.3.2. Amostras de material fecal (swab retal, LAR e fezes frescas) de primatas não humanos (PNH)

Cinquenta e um animais da espécie *Macaca mulatta* (rhesus) e vinte e nove animais da espécie *Macaca fascicularis* (cynomolgus) foram utilizados como doadores de LAR e swab retais e 10 animais da espécie *Macaca mulatta* e 7 animais da espécie *Macaca fascicularis* foram utilizados como doadores de fezes frescas (todos animais adultos com mais de 2 anos de vida).

O LAR foi necessário, já que durante a captura dos animais, no manejo médico, ocorre um esvaziamento fisiológico da ampola retal, sendo difícil a coleta de fezes frescas em quantidade suficiente para a montagem de um painel de amostras para avaliação da acurácia do teste ELISA IgY anti-*Campylobacter* spp. deste estudo. A coleta dos swabs retais foi necessária para a realização do cultivo microbiológico para pesquisa de *Campylobacter* spp. e detecção de bactérias entéricas desses animais. Houve a oportuni-

dade da coleta de fezes frescas, já que alguns destes animais foram confinados individualmente por conta do monitoramento sanitário anual.

Com os animais anestesiados, foi coletado material fecal por meio da utilização de swab estéril que, após introdução na ampola retal, foi acondicionado em meio de transporte Cary & Blair. O LAR foi realizado com auxílio de sonda nº 8 para cynomolgus e nº 10 para rhesus. Foi utilizada seringa estéril de 20 mL acoplada a sonda para introdução de 15 mL de solução fisiológica 0.9% estéril na ampola retal, e logo após foi coletado, por sucção, o máximo volume possível. As fezes frescas foram obtidas da bandeja localizada abaixo de cada gaiola individual. O material foi acondicionado em tubo cônico estéril de 15 mL de forma a recolher o material do topo do bolo fecal, sem contato com a bandeja. Em seguida este tubo foi acondicionado a -20°C. O quantitativo de amostras coletadas foi: 80 swabs retais; 80 LAR; 17 fezes frescas colhidas individualmente.

O LAR de cada animal foi então levado ao laboratório, dividido em duas partes e, posteriormente, cada uma das partes foi centrifugada a 3000 xg por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e uma das partes foi ressuspensa em 2 mL de PBS (0,018 M, pH 7,2) e a outra em 2mL de formalina 0,5%. A partir deste material, foram preparadas alíquotas de 1mL, as porções ressuspensas em salina foram congeladas e as ressuspensas em formol acondicionadas e estocadas à 4°C.

5.3.3. Amostras de fezes humanas para controle negativo

Para a determinação dos parâmetros de negatividade, foram utilizadas três amostras de fezes humanas cedidas pelo Laboratório de Parasitologia Ambiental do DCB/ENSP. Esta medida foi necessária, pois devido as características de criação dos animais, que vivem em confinamento em regime de harém (grupos sociais formados por vários animais no mesmo recinto), tornou-se inviável identificar entre as amostras coletadas aquelas que apresentavam resultado verdadeiramente negativo. Ressalta-se que as referidas amostras humanas seriam descartadas. Neste estudo, foram utilizadas sem fins de diagnóstico clínico ao doador e eram codificadas pelo laboratório cedente, não sendo

possível sua identificação. Para fins de utilização como controle negativo houve a necessidade da confirmação da negatividade dessas amostras por meio da realização do cultivo bacteriológico para *Campylobacter* spp. de acordo com item 5.4.1.1.

5.4. MÉTODOS

5.4.1. Painel de amostras e sua caracterização microbiológica

5.4.1.1. Detecção de *Campylobacter* spp.

Os swabs que haviam sido acondicionados em meio mínimo Cary & Blair para transporte, foram posteriormente semeados em meio de cultura seletivo à base de ágar Columbia (anexo 1), acrescido com 0,4g% de carvão ativado, 0,5mL% de solução redutora de oxigênio (FBP-0,5mL% de sulfato ferroso, bissulfito de sódio e piruvato de sódio) e 0,5mL% solução de antibiótico (cefalotina 81mg+ lactato de trimetoprim 25mg + vancomicina 50 mg + actidione 10mg + colistina 11mg + água destilada 25mL). As placas contendo os meios semeados por esgotamento, foram incubadas a 42°C por 48 horas (temperatura ideal para isolamento de *Campylobacter* termofílico), em atmosfera ideal de microaerofilia, gerada pelo método da passivação de cobre (ANDRADE *et al.*, 2007).

Após a incubação, o diagnóstico inicial foi realizado com base na morfologia colonial (transparentes com brilho d'água) e características morfo-tintoriais em microscopia de campo claro, a partir do método de Gram, seguindo a descrição de Lauria-Filgueiras e Hofer (1998). A identificação presuntiva das amostras foi obtida pela observação de bastonetes curvos ou em forma de "S", Gram negativos ou presença de células cocóides, características de amostras em estágio degenerativo.

Quando as amostras apresentaram colônias típicas e morfologia esperada, foram realizados, para diagnóstico confirmatório, uma série de testes bioquímicos clássicos (Figura 3) para confirmação do gênero bacteriano e identificação ao nível de espécie (ANDRADE *et al.*, 2007; BRASIL, 2011). Antes da avaliação bioquímica, uma alíquota da amostra foi armazenada em tubo contendo água peptonada pH 7,0-7,2, com 20% de glicerol e estocada a -70°C seguindo as recomendações de Esteves (2011).

	catalase	Redução de nitrito	Redução de nitrito	urease	H2S(TSI)**	Hidrólise Hipurato	Crescimento a 15°C	Crescimento a 25°C	Crescimento a 42°C	Crescimento a 3,5% NaCl	Crescimento a 1% glicina	Ágar Macconckey	Sensibilidade Ácido Naxílico	Sensibilidade Cefalotina
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	S	R
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doviei</i>	v	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+	-	S	S
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	S	R
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	V	S
<i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	R	S
<i>C. lari</i>	+	+	-	V	-	-	-	-	+	-	+	+	R	R
<i>C. upsaliensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	V	+	S	S*
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	R	S
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	S	S
<i>C. sputorum</i> biovar <i>bubulus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	R	S
<i>C. sputorum</i> biovar <i>fecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	R	S
<i>C. helveticus</i>	-	+	ND	ND	-	-	-	-	+	V	V	ND	S	S
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	R	S
<i>C. concisus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	R	R
<i>C. curvus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	ND	S	ND
<i>C. rectus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	ND	S	ND
<i>C. showae</i>	+	+	ND	-	+	-	-	-	+	-	V	ND	R	S
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> grupo 1A	+	V	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	V	R
<i>A. cryaerophilus</i> grupo 1B	+	V	ND	-	-	-	+	+	-	-	-	+	S	V
<i>A. nitrofigilis</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	S	S
<i>A. butzleri</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	V	V	+	+	S	R
<i>A. skirrowii</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	V	V	V	-	S	S

Figura 3: Quadro do perfil bioquímico das espécies do gênero *Campylobacter*

* (reação fraca) S (sensível) + (positivo) v (reação variável) R (resistente) - (negativo) ND (Não determinado) ** TSI (Ágar três açúcares e ferro) Fonte: (BRASIL, 2011)

5.4.1.2. Detecção de *Enterobacteriaceae* nas amostras dos PNH

Os swabs conservados em meio Cary & Blair foram também transportados ao Laboratório de Microbiologia (LabMicro) no Departamento de Ciências Biológicas – ENSP/Fiocruz, para a avaliação da microbiota bacteriana intestinal, através de inoculação em meios de enriquecimento, meios seletivos indicadores (Ágar EMB, Ágar MacConkey, Agar SS (*Salmonella-Shigella*)) e meio cromogênico (Chromagar) para pesquisa de bactérias entéricas.

Após isolamento, as colônias bacterianas foram visualizadas, foi realizada a coloração de Gram e posteriormente estes micro-organismos foram identificados através de provas bioquímicas seguindo as recomendações de Costa e Hofer (1972) e Nogueira e Souza-Miguel (2010) (Tabela 2).

Nos casos duvidosos o esclarecimento da identificação da espécie bacteriana foi feito de forma automatizada pelo aparelho VITEK® (marca Biomerieux).

Tabela 2: Tabela de percentuais para diferenciação bioquímica das principais enterobactérias pesquisadas

	<i>Escherichia coli</i>								<i>Citrobacter</i>				<i>Klebsiella</i>				<i>Enterobacter</i>				<i>Paenococcus agglomerans</i>	<i>Hafnia alvei</i>					<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia</i>			<i>Yersinia</i>		
	Shigella, grupos A, B, C	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	<i>Salmonella</i> Livingstone subg. IIIa	<i>Salmonella</i> Livingstone subg. IIIb	<i>Freundii</i>	<i>diversus (koseri)</i>	<i>ammonii</i>	<i>puschmansi</i>	<i>oxytoca</i>	<i>aerogenes</i>	<i>cloacae</i>	<i>garguriae</i>	<i>solitaria</i>	<i>marescens</i>	<i>liquefaciens</i>	<i>rubidaea</i>	<i>nitrospina</i>		<i>vaughanii</i>	<i>refrigerii</i>	<i>stuartii</i>	<i>alkalifaciens</i>	<i>enterocolitica</i>		<i>pestis</i>	<i>pseudotuberculosis</i>				
																														Indol	Vermelho de metila	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons
Indol	98	50	0	99	0	0	2	0	33	99	100	0	99	0	0	11	20	0	1	1	0	2	98	98	99	98	99	50	0	0			
Vermelho de metila	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10	20	5	5	5	5	50	40	20	93	20	97	95	97	93	100	99	97	80	100		
Voges-Proskauer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	95	98	100	100	100	70	85	98	93	100	50	0	0	0	0	2	0	0			
Citrato de Simmons	1	0	0	1	25	25	99	98	78	99	95	98	95	95	100	99	99	50	10	98	90	95	65	15	0	95	93	98	0	0			
H ₂ S (TSI)	1	0	0	100	50	50	99	100	78	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	95	5	0	0	0	0	0			
Urease	1	0	0	0	0	0	0	2	44	75	85	95	90	2	65	93	1	20	4	15	3	2	98	95	98	98	30	0	75	5	95		
KCN	3	0	0	0	0	0	1	95	89	0	99	98	97	98	98	0	99	65	95	95	90	25	98	99	98	97	100	100	2	0	0		
Motilidade (36°C)	95	0	0	98	95	95	99	99	89	95	95	0	0	97	95	90	96	85	85	97	95	85	95	95	95	94	85	96	2	0	0		
Gelatina (22°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	89	0	99	0	0	0	0	0	0	2	0	90	90	90	90	91	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lisina- Descarboxilase	90	0	0	100	95	95	99	100	0	0	0	98	99	98	0	90	0	0	100	99	95	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Arginina-Dihidrolase	17	5	2	0	55	55	70	70	65	80	85	0	0	0	97	0	99	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Omitina- Descarboxilase	65	1	98	100	100	100	99	100	0	99	95	0	0	98	96	100	91	0	98	99	95	0	99	0	98	0	0	1	95	0	0		
Fenilalanina-Desaminase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	50	20	0	0	0	0	98	99	95	98	95	98	0	0	0	0	
Malonato	0	0	0	0	0	0	95	0	11	95	1	93	98	95	55	96	18	65	50	3	2	94	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Gás de Glicose	95	2	0	100	95	95	85	0	89	98	97	97	97	100	100	98	98	20	98	55	75	30	96	85	90	10	0	85	5	0	0		
Lactose	95	0	2	0	0	0	85	0	78	50	35	98	100	95	93	55	99	40	5	2	10	100	2	2	1	5	2	0	5	0	0		
Sacarose	50	0	1	0	0	0	5	0	89	40	9	99	100	100	97	98	100	75	10	99	98	99	15	97	0	15	50	15	95	0	0		
D-Mannitol	98	93	99	0	98	98	100	98	100	99	100	99	99	100	100	99	100	100	99	99	100	100	0	0	0	100	10	2	98	97	100		
Dulcitol	60	2	0	0	5	5	1	0	11	40	1	30	55	5	15	0	5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sorbitol	40	0	0	0	0	0	0	60	0	15	30	99	100	100	75	99	99	65	13	95	97	99	0	50	0	50	2	1	20	70	25		
Adonitol	5	0	0	0	0	0	0	0	0	98	0	90	99	98	25	0	0	7	0	40	5	99	0	0	0	100	5	98	0	0	0	0	
Mio-Inositol	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	95	98	95	15	0	75	15	0	75	60	20	0	0	0	90	95	1	30	0	0		
D-Sorbitol	94	30	2	0	90	90	99	99	100	99	99	99	99	100	95	0	0	30	0	99	95	1	0	0	0	1	1	1	99	50	0		
L-Arabinose	99	60	95	9	0	0	99	99	100	100	99	99	98	100	100	99	100	95	95	0	98	100	0	0	0	0	1	1	98	100	50		
Rafinose	50	50	3	0	1	1	1	1	44	0	5	99	100	96	97	97	99	30	2	2	85	99	1	1	0	5	7	1	5	0	15		
L-Raminose	80	5	75	0	100	100	99	99	99	100	99	99	100	99	92	99	100	85	97	0	15	1	1	5	0	70	0	0	1	1	70		
Esculina	35	0	0	0	0	0	1	1	0	1	5	99	100	98	30	97	100	60	7	95	97	94	0	50	0	35	0	0	25	50	95		
DNase (25°C)	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	85	99	50	80	0	0	10	0	5	0	0		

Obs₁: *Shigella* grupo A, B, C diferenciação: Grupo A: manitol (-), Grupo B e C: manitol (+). A diferenciação final é sorológica.

Obs₂: Para identificação completa de *Salmonella* e *Escheria coli*, deverá ser realizada sorologia complementar.

Fonte: Nogueira e Souza-Miguel, 2010.

5.5. Preparação do antígeno imunizante e a inoculação das aves para produção de IgY:

5.5.1. Parâmetros de produção do extrato bruto proteico

Para determinar as condições para obtenção do antígeno imunizante foi necessário estimar a quantidade de massa bacteriana, por isso, inicialmente, duas placas foram semeadas com *C. jejuni* (ATCC 33291) seguindo o descrito no item 5.4.1.1. As colônias obtidas foram inativadas com solução salina enriquecida com 0,5% de formol e incubadas a 4°C “overnight”. A suspensão obtida foi submetida a dez lavagens seguidas de centrifugação a 1000 x g, a 4 °C por 30 minutos com suspensão final em PBS 1X pH 7.2. O material foi novamente centrifugado a 1000 x g a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final foi ressuspensão em solução tampão Tris-Hcl (50 mM) pH 7.5.

Para determinar a melhor forma do processo de rompimento da parede celular, foram testados dois diferentes protocolos de sonicação, os dois primeiros utilizando material diluído em tampão Tris-Hcl (50 mM) pH 7.5 (UEKI,1988). O primeiro utilizou a sonicação com ultrassom por imersão em banho de água (Cole Parmer Modelo: 8853), utilizando 3 pulsos de 30 segundos de 60 Hertz com dois minutos de intervalo entre eles. O segundo utilizou o sonicador de ponta e o material em banho de gelo (Misonix ultrasonic liquid processors, modelo XL2000 marca MISONIX®), empregando 3 pulsos de 2 watts de 15 segundos, com intervalo de 40 segundos). Após procedimentos de rompimento, pellets e sobrenadantes foram centrifugados a 1000 xg por 30 minutos, avaliados por SDS-PAGE (anexos 4 e 5) em seguida foi determinada a concentração de proteínas utilizando o kit de quantificação de proteínas totais por BCA (ThermoFisher®) utilizando as determinações do fabricante.

5.5.2. Produção do antígeno imunizante de *Campylobacter jejuni*

De acordo com os resultados de parâmetros iniciais de obtenção de extrato bruto proteico, foram semeadas 10 placas, seguindo a metodologia descrita no item 5.5.1. A massa bacteriana foi submetida a sonicação utilizando sonicador de ponta (Misonix ultrasonic liquid processors, modelo XL 2000 marca MISONIX®) com 3 pulsos de 2 watts de 15 segundos com intervalo de 40 segundos). Após a lise, o material foi centrifugado a 1000 xg por 30 minutos a 4°C, avaliado por SDS-PAGE e novamente centrifugado (3000 xg por 15 minutos a 4°C graus). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em tampão de lise (100mM de KCl, 10mM tris pH6.8 e 5 mM EDTA) (GREEN; SAMBROOK, 2012). Um novo processo de sonicação foi realizado utilizando sonicador de ponta (Misonix ultrasonic liquid processors, modelo XL2000 marca MISONIX®) com 5 pulsos de 2 watts de 15 segundos com intervalo de 40 segundos em banho de gelo em função do material bacteriano mais concentrado. O material foi submetido a ultracentrifugação por 100 000 g por 60 minutos a 4°C (Ultracentrifuga Thermoscientific Sorvall WX Series modelo WX ultra 80 com rotor 50 TI) e repetida alternado com a suspensão em tampão através da lavagem com PBS para realizar a lavagem do material. Ao fim das três lavagens por ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de proteínas suspenso em tampão detergente (0,1M de NaCl+2% de triton X-100), por 1 hora a 37°C em banho maria. Após esta incubação, as três lavagens foram repetidas utilizando a ultracentrifugação. A suspensão final foi novamente avaliada por SDS-PAGE e quantificada pelo kit de BCA (Termoficher®) utilizando as instruções do fabricante. A conservação foi realizada a -20°C até a imunização.

5.5.3. Produção e caracterização das Imunoglobulinas Y

5.5.3.1. Imunização das galinhas poedeiras:

Este procedimento foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA-Fiocruz. Número da licença: LW-16/17 (Anexo 5). Foi utilizada uma galinha poedeira da raça Isa Brown, com idade entre 18-20 semanas. A ave foi selecionada quanto ao peso médio de 1,8 Kg e mantida individualmente recebendo ração específica para postura e água potável *ad libitum*. No primeiro inóculo o extrato bruto proteico de *C. jejuni* foi emulsionado em 250 µL de adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich®). Já nas duas inoculações seguintes, foi utilizado o mesmo antígeno emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich®) (SANTOS,2012). As três inoculações (Figura 4) ocorreram com intervalos de 1 semana, por via intramuscular na musculatura peitoral (*Musculus pectoralis*) com um volume final de 0,5mL, distribuídos em vários pontos. Após um intervalo de 20 dias do último inóculo, os ovos começaram a ser colhidos diariamente por 4 meses e estocados de 4 a 8°C até o momento da extração. Durante a inoculação e todo o período de produção dos ovos, a ave foi avaliada clinicamente pelo veterinário responsável pelo projeto.

1ª Dose (semana 1)	2ª Dose (semana 2)	3ª Dose (semana 3)
200µg de extrato bruto proteico+ 250 µL de adjuvante Completo de Freund	200µg de extrato bruto proteico + 250 µL de adjuvante Incompleto de Freund	

Figura 4: Esquema de inoculações da ave

5.5.3.2. Extração de IgY

O isolamento foi realizado utilizando precipitação por Polietilenoglicol 6000 (PEG - Sigma Aldrich®) (POLSON *et al.*,1980; POLSON *et al.*,1985). 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 xg por 25 minutos a 5°C negativos. O precipitado foi dissolvido em 2,0 mL de PBS e submetido a congelamento até a utilização (Polson *et al.*, 1985).

5.5.3.3. Purificação da IgY utilizando a coluna “Hi-Trap IgY purification”

Após a extração, foi preparado um pool com as IgY(coletadas nos dias:5,8,19,28,34,35,47,51, 59, 60,63 após a ultima inoculação. A suspensão foi submetida a um processo de purificação utilizando adsorção tiofílica em coluna Hi-Trap IgY purification (GE, Healthcare). Seguindo o protocolo do fabricante (anexo 6), a coluna foi conectada a um cromatógrafo de HPLC (AKTA protein purification system-Amershan) para demonstração da representação gráfica do perfil (eletroferograma) de purificação final de cada passagem de amostra na coluna, através da leitura individual de cada fração (2 mL). Foram realizadas 3 passagens de IgY extraída para purificação. Para cada passagem as amostras e a coluna foram submetidas a um processo de preparação conforme as instruções do fabricante. Um total de 100 mg de IgY extraída foi aplicada. A 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). A IgY purificada foi separada através das maiores leituras de absorbância a 280 nm.

5.6. Caracterização, perfil de produção e análise da especificidade frente ao antígeno imunizante

5.6.1. Caracterização da IgY anti- *C. jejuni* por SDS-PAGE

Foram selecionadas para avaliação as suspensões dos seguintes dias após a última inoculação: dia 28, dia 33, dia 37, dia 44 e dia 47. Estas foram descongeladas e diluídas 1:4 em tampão de amostra, desnaturadas por choque térmico e aplicadas no gel de poliacrilamida 12% com gel de empilhamento a 4% para realizar a corrida eletroforética por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Após a corrida eletroforética, o gel obtido foi corado pelo comassie R-250 de acordo como protocolo desenvolvido no LATER-Biomanguinhos (Anexo 4).

5.6.2. Determinação da concentração de IgY anti *C. jejuni* após a extração e purificação

A concentração de IgY após extração 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 (LESLIE; CLEM, 1969).

5.6.3. Verificação da especificidade da IgY anti *C. jejuni* por Western blot

As bactérias da família Enterobacteriaceae inicialmente isoladas dos swabs retais e já identificadas previamente quanto ao gênero/espécie, foram semeadas em meio líquido BHI por 24 horas a 37°C a fim de produzir massa bacteriana. As amostras, após crescimento, foram centrifugadas a 22.000 xg por 2 minutos na TA para retirada do

meio de cultura e foram diluídas em salina estéril. Os micro-organismos isolados utilizados para a realização do teste foram: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, e *Enterobacter* sp. Neste experimento, não foi obtido o crescimento para as cepas isoladas de: *Citrobacter* sp. e *Klebsiella pneumoniae* por isso não foi possível a inclusão. Foi realizado o SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970). A eletrotransferência foi realizada a 100 V, durante 120 minutos (TOWBIN *et al.*, 1979). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 5% de Leite desnatado Molico - Nestlé®) “overnight” 4°C em agitação lenta. Realizou-se lavagens em TA por 5 minutos, três vezes com solução de lavagem em PBS-T (PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween-20). As membranas foram incubadas com IgY anti-*Campylobacter jejuni* purificada em solução de bloqueio na diluição de 1:250 por 2 horas a 37°C em agitação lenta. As membranas foram lavadas e submetidas à incubação com conjugado anti-IgY (Sigma Aldrich®) a 1:8000 por 1 hora a 37°C em agitação lenta em solução de bloqueio. Para revelação foi utilizada solução de revelação (tampão Citrato-Fosfato (Sigma Aldrich®), peróxido de hidrogênio 30-32% supra (Vetec®) e 3’3’ diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Sigma Aldrich®) até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com água destilada.

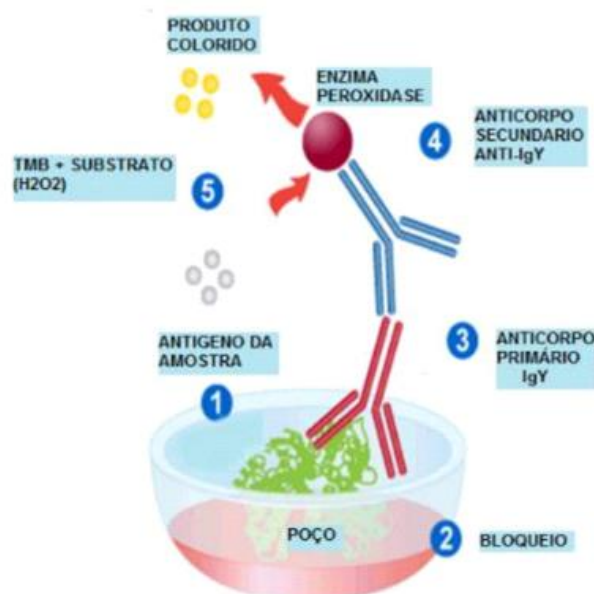
5.6.4. Verificação do reconhecimento da especificidade da IgY anti - *C. jejuni* extraída por ELISA

Para análise da especificidade da IgY extraída frente a *C. jejuni*, placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc) de fundo chato, foram sensibilizadas com 50 µL de *C. jejuni* em diferentes concentrações (de 1:25 a 1: 2,19 x 10¹³.) em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6 – Sigma Aldrich®), incubadas de 4 a 8°C “overnight”. Após três lavagens num volume de 250 µL com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20), foram adicionadas 50 µL das diferentes concentrações de IgY extraída (1:10 a 2,19 x 10¹¹) e IgY purificada (1:1000 a 1:2 048 000) em solução de diluição (PBS 0,05% de Tween 20 contendo substâncias bloqueadoras). As

substâncias bloqueadoras testadas foram leite desnatado Molico- Nestlé® nas concentrações de 1%, 2%, 5% e 10 % e BSA (soro albumina bovina) nas concentrações de 1%, 5% e 10%. Após, foi realizada incubação (1h a 37°C) e lavagens conforme descrito anteriormente. Foram adicionados 50 µL anti-IgY conjugada a peroxidase (Sigma Aldrich®) utilizada nas diluições de 1:1000, 1:8000, 1:30 000 respectivamente em solução de diluição, seguidas de incubação por 1h à 37°C. Após nova lavagem, a revelação foi realizada, protegida da luz, com 50 µL de solução reveladora TMB (tetrametilbenzidina-Sigma Aldrich®) por um período de vinte a trinta minutos observando os controles adquirir coloração. A reação foi paralisada com 50 µL de ácido sulfúrico 1M (VOLLER; D. E. BIDWELL; BARTLETT, 1976). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Test Line–Biotech Instruments, USA), com filtro de referência de 450nm (recomendação do fabricante da solução de revelação).

5.7. Verificação da capacidade do reconhecimento dos antígenos de *C. jejuni* pela IgY nas amostras de fezes e de LAR por ELISA indireto

Neste trabalho, foi desenvolvido um teste de ELISA do tipo indireto “in house” que segue a metodologia esquematizada na Figura 5 para fazer as avaliações das amostras. O teste teve início com a fixação do antígeno na placa, a etapa seguinte consistiu na aplicação do anticorpo primário que reconheceu o antígeno. A segunda etapa consistiu no reconhecimento do anticorpo primário por um anticorpo secundário conjugado a uma enzima (peroxidase). Com a adição de um cromógeno e substrato da enzima houve a produção de moléculas coloridas, que permitiu a medição da intensidade da reação. A reação foi interrompida com aplicação de ácido para a leitura visual e /ou quantitativa.



Fonte :traduzido do site :https://www.leinco.com/indirect_ELISA. Acessado em 14/06/2017

Figura 5: Esquema de ELISA indireto

5.7.1. Avaliação dos parâmetros para utilização do ELISA com a IgY - anti-*Campylobacter* spp. “in house”

Antes da utilização do método ELISA indireto com a IgY produzida, foi necessário o ajuste da concentração das amostras de LAR (positivas e negativas de acordo com o cultivo microbiológico), fezes humanas (negativas de acordo com o cultivo microbiológico), IgY purificada anti - *C jejuni*, do conjugado anti-IgY comercial, e de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291) lisada (considerada controle positivo - que foi obtida por meio do cultivo conforme item 5.4.1.1 e lisada por meio de diluição em água estéril e congelamento a-20°C). As fezes humanas foram previamente diluídas a 0,25 g/mL em solução salina estéril (0,9%) (ELSEMORE *et al.*, 2017). Após essa diluição, amostras de LAR, *C. jejuni* lisada e fezes humanas foram diluídas a 1:10, 1:20 e 1:40 em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) e adicionadas num volume de 50 µL em placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc) com incubação de 4 a 8°C “overnight”. Após a incubação as placas foram lavadas 5

vezes com 250 µL de PBS-T, seguida da aplicação de 50 µL da IgY purificada anti-*C. jejuni* diluída nas seguintes concentrações: 1:250, 1:500 e 1:1000 em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 1% de Leite desnatado Molico- Nestlé®) com incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T e adicionado 50 µL de conjugado anti-IgY (Sigma Aldrich®) diluído 1:8000 em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 1% de Leite desnatado Molico- Nestlé®), com incubação a 37°C/1 h em câmara úmida, seguido de 3 lavagens com PBS-T. A revelação foi realizada utilizando 50 µL de TMB (tetrametilbenzidina- Sigma Aldrich®) de vinte a trinta minutos em TA. A reação foi paralisada com 50 µL de ácido sulfúrico 1M (VOLLER *et al.*, 1976). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Test Line–Biotech Instruments, USA), com filtro de referência de 450nm (protocolo de leitura estabelecido pelo fabricante do TMB - recomendação do fabricante da solução de revelação).

5.7.2. Aplicação das amostras do painel no teste de ELISA contendo a IgY anti-*Campylobacter* spp. purificada (*in house*)

Placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL do material do painel de amostras de LAR (1:10) e fezes (0,025 mg/mL) de PNH, como controles positivos foram utilizadas, amostras de LAR positivas para *C. jejuni* no cultivo (1:10) e cepa de *C.jejuni* lisada (1:20 e 1:40); como controles negativos, fezes humanas (0,025 g/mL), diluídas em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) e incubadas de 4 a 8°C “overnight”. Após a incubação as placas foram lavadas 5 vezes com 250 µL de PBS-T, seguida da aplicação de 50 µL da IgY purificada anti-*C.jejuni* diluída 1:1000 em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 1% de Leite desnatado Molico- Nestlé®), com incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após foram realizadas 3 lavagens com PBS-T e adicionado 50 µL do conjugado anti-IgY (Sigma Aldrich®) em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 1% de leite desnatado Molico- Nestlé®) diluído 1:8000, com incubação por 1 horas

37°C em câmara úmida, seguido de 3 lavagens com PBS-T. A revelação foi realizada utilizando 50 µL de TMB (tetrametilbenzidina- Sigma Aldrich®) em incubação de vinte minutos em TA ao abrigo da luz. A reação foi paralisada com 50 µL de ácido sulfúrico 1M (VOLLER *et al.*, 1976). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Test Line–Biotech Instruments, USA), com filtro de referência de 450nm (protocolo de leitura estabelecido pelo fabricante do TMB).

5.7.3. Teste de dopagem das amostras de LAR

Antes de sensibilizar com as amostras de LAR (positivas na cultura e negativas no ELISA), foram diluídas 1:5 em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6). A suspensão de bactérias lisadas foram diluídas 1:50 em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6). Essa diluição foi aplicada em duplicata (50 µL) na placa de ELISA (Maxi Sorb, Nunc). Em seguida, as amostras de LAR sofreram dopagem, cada poço recebeu 50 µL da diluição da bactéria lisada. Para os poços de controle positivo foi aplicada, além dos 50 µL da diluição da bactéria lisada, mais 50 µL de pbs estéril. A placa foi incubadas de 4 a 8°C “overnight”. Após a incubação a placa foi lavada 5 vezes com 250 µL de PBS-T, seguida da aplicação de 50 µL da IgY purificada anti-*C. jejuni* diluída 1:1000 em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 1% de leite desnatado Molico- Nestlé®), com incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após foi realizada 3 lavagens com PBS-T e adicionado 50 µL do conjugado anti-IgY (Sigma Aldrich®) em solução de bloqueio (PBS 0,05% de Tween-20 e 1% de leite desnatado Molico- Nestlé®) diluído 1:8000, com incubação por 1 horas 37°C em câmara úmida, seguido de 3 lavagens com PBS-T. A revelação foi realizada utilizando 50 µL de TMB (tetrametilbenzidina- Sigma Aldrich®) em incubação de vinte minutos em TA ao abrigo da luz. A reação foi paralisada com 50 µL de ácido sulfúrico 1M (Voller *et al.*, 1976). Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Test Line–Biotech Instruments, USA), com filtro de referência de 450nm (protocolo de leitura estabelecido pelo fabricante do TMB).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Painel de amostras e sua caracterização

Como já dito anteriormente, a criação deste painel visou detectar as bactérias pertencentes a microbiota intestinal dos PNH para auxiliar na avaliação da detecção exclusiva de *Campylobacter* do teste imunoenzimático construído durante o desenvolvimento deste estudo, todavia, várias informações pertinentes podem ser discutidas a partir dos achados deste material.

As amostras de swabs retais coletados da espécie *Macaca fascicularis* apresentaram em todos os espécimes, presença de membros da família Enterobacteriaceae (bastonetes Gram negativos que realizam redução de nitrato a nitrito, fermentação de glicose e não possuem a enzima citocromo-oxidase). Esta família, inclui uma série de bastonetes Gram negativos, cuja maioria habita o intestino dos seres humanos e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (TRABULSI et al. 1999).

Segundo Costa e Hofer (1972) e de Nogueira e Souza-Miguel (2010), a diferenciação dos gêneros e espécies pode ser realizada fenotipicamente por meio de uma série de provas bioquímicas usadas na prática laboratorial, como já descrito na Metodologia (Tabela 2). As metodologias semi-automáticas e totalmente automatizadas, também seguem as mesmas regras, porém adicionam mais provas para facilitar a identificação. Segundo Trabulsi e colaboradores (1999) nos últimos anos a biologia molecular tem avançado para auxiliar nesta identificação, todavia segundo Abrantes e Nogueira (2017), os métodos fenotípicos, apesar de não serem a metodologia mais moderna e nem definitiva, como as análises moleculares, podem contribuir de forma muito positiva e econômica no âmbito laboratorial.

As provas bioquímicas realizadas neste estudo, a partir dos swabs coletados de *Macaca fascicularis*, permitiram identificar as seguintes espécies da família Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* (100%), *Klebsiella pneumoniae* (79,31%), *Citrobacter* sp. (10,34%), *Proteus* sp. (13,79%), *Enterobacter* sp. (17,24%) e *Yersinia enterocolitica* (3,45%) (Tabela 3).

Tabela 3. Enterobacteriaceae isoladas de amostras do material fecal de *Macaca fascicularis* em criatório científico.

Bactérias identificadas	N.º de amostras positivas (Total de animais = 29)	Percentual de isolamento (%)
<i>Escherichia coli</i>	29	100,00%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	79,31%
<i>Citrobacter</i> sp.	3	10,34%
<i>Proteus</i> sp.	4	13,79%
<i>Enterobacter</i> sp.	5	17,24%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	3,45%

Os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* (que fazem parte do grupo chamado de bacilos coliformes) e *Proteus* se enquadraram, segundo Guentzel (1996), no que já foi definido anteriormente como característica da família Enterobacteriaceae, já que apesar de serem considerados micro-organismos oportunistas e poderem ser responsáveis por uma ampla gama de infecções, são também membros da microbiota intestinal normal de humanos e outros animais e podem ser isolados de uma variedade de fontes ambientais. A espécie *Escherichia coli* (*E. coli*), por exemplo, é o organismo mais comumente isolado nos laboratórios clínicos. Essa informação corrobora com os achados de Cruz e colaboradores (2016) que pesquisaram a microbiota intestinal de uma colônia de Cynomolgos de cativeiro e encontraram em todos os espécimens analisados esse micro-organismo presente.

Quando avaliamos os achados de *Yersinia* sp. e sua relevância neste estudo, não podemos deixar de observar os trabalhos de McClure e colaboradores (1986), pois segundo estes autores, apesar deste micro-organismo ser considerado relativamente frequente em primatas não humanos da espécie *Macaca fascicularis*, esse fato não afasta a sua importância e sua possível participação em eventos gastro-intestinais nestes animais, principalmente quando o isolamento é da espécie *Yersinia enterocolitica*, já que em primatas não humanos, essa bactéria já foi identificada causando diarreias com ou sem sangue, enterocolites ulcerativas e linfadenites mesentéricas sendo considerada, então, potencialmente patogênica. Segundo Lopes e colaboradores (2010), a espécie *Yersinia enterocolitica* é uma das principais bactérias patogênicas do gênero

associada a agravos intestinais em primatas.

Estudos epidemiológicos têm sido realizados a fim de se investigar e determinar a ocorrência de enterobactérias em grupos de animais selvagens mantidos em cativeiro visto à possibilidade de comprometimento da saúde desses animais (GOMES et al., 2011; FERREIRA et al., 2012), todavia há outros micro-organismos bacterianos de grande importância em criatórios, que podem resultar em doenças com altos índices de morbidade e mortalidade e que também possuem relevância para a realização do controle sanitário, como por exemplo o gênero *Campylobacter* (Lopes e colaboradores (2010)). Esse micro-organismo têm apresentado um alto índice de isolamento em primatas não humanos (McCLURE et al., 1986). Chegando a ser considerado por Lopes e colaboradores (2010) como endêmico em algumas colônias de primatas. Esses dados corroboram com os nossos achados, já que em relação ao cultivo de *Campylobacter* spp. foi demonstrado que 22 (76%) dos animais apresentaram cultivo positivo no material fecal para o gênero, sendo que em 48,28% das amostras foi encontrada *Campylobacter coli*, 13,79% apresentaram *Campylobacter jejuni* e em 13,79 % não foi possível definir a espécie isolada pela metodologia aplicada (Tabela 4). Gonçalves de colaboradores (2010) relatam que *Macaca fascicularis* tem o hábito diurno, e a preferência alimentar por pequenos insetos, o que leva aos animais a se alimentar dos insetos caídos no chão e se reinfestar, esse fato, pode ser uma justificativa para a persistência de percentuais de animais portadores de *Campylobacter* sp. superior a 70%, mesmo com a implementação de medidas de prevenção e higiene descritas por Andrade e colaboradores (2007), como autoclavação da ração, dos instrumentos de lazer e higienização das frutas com hipoclorito.

Tabela 4- Isolamento *Campylobacter* spp. nas fezes de *Macaca fascicularis* em criatório científico.

Bactérias identificadas	N.º de amostras positivas (Total de animais = 29)	Percentual de isolamento (%)
<i>Campylobacter coli</i>	14	48,28%
<i>Campylobacter jejuni</i>	4	13,79%
<i>Campylobacter</i> sp.	4	13,79%

Na colônia de *Macaca mulatta*, de forma semelhante ao que foi visto em *Macaca*

fascicularis, as amostras de swabs retais coletados apresentaram em todos os animais presença de espécies bacterianas da família *Enterobacteriaceae*. Apesar de haverem mais indivíduos avaliados nesta colônia, o percentual de isolamento foi menor para esses primatas que no grupo anterior. As seguintes espécies foram encontradas: *Escherichia coli* (100%), *Klebsiella pneumoniae* (50 %), *Citrobacter* sp. (30,77%), *Proteus* sp. (11,54%), *Enterobacter* sp. (11,54%) (Tabela 5).

Tabela 5 – *Enterobacteriaceae* isoladas de amostras do material fecal *Macaca mulatta* de criatório científico.

Bactérias identifica- das	Nº de amostras positivas (Total de animais = 52)	Percentual de isola- mento %
<i>Escherichia coli</i>	52	100,00%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	50,00%
<i>Citrobacter</i> sp.	16	30,77%
<i>Proteus</i> sp.	6	11,54%
<i>Enterobacter</i> sp.	2	3,85%

Na colônia de *M.mulatta*, 73% do material fecal dos indivíduos avaliados, apresentou somente bactérias pertencentes à microbiota normal. Seguindo a premissa de que conhecer a microbiota bacteriana de animais de cativeiro é de extrema importância para definir sua condição sanitária (CRUZ *et al.*, 2016), pôde-se sugerir que os animais pertencentes à colônia analisada neste estudo, possuem uma boa qualidade microbiológica, para utilização em experimentação como biomodelos.

Estudos anteriores indicaram várias espécies do gênero *Macaca* como suscetíveis ao *Campylobacter* sp. (CYSNE, 2007; LAURIA-FILGUEIRAS, 2000; LAURIA-FILGUEIRAS; HOFER, 1998), tornando-se então, importante o monitoramento deste agente, já que sua presença pode ser um possível indicador de determinação do status sanitário da colônia (FELASA, 1999).

De forma positiva, com a realização da técnica clássica de cultivo, não foi possível demonstrar nas amostras de *M.mulatta* a presença de *Campylobacter* spp. em 38 (73 %) das amostras dos animais, já que não foi detectado nenhum tipo de crescimento

nos meios seletivos. Neste grupo de primatas, somente 14 (27 %) animais apresentaram cultivo positivo para o gênero, destes, em 13,46% das amostras foi encontrada *C. coli*, 11,54% apresentaram *C. jejuni* e em 1,92% não foi possível definir a espécie (Tabela 6).

Tabela 6 – Isolamento *Campylobacter* spp. em fezes de *Macaca mulatta* em criatório científico.

Bactérias identificadas	Nº de amostras positivas (Total de animais = 52)	Percentual de isolamento %
<i>C. coli</i>	7	13,46%
<i>C.jejuni</i>	6	11,54%
<i>Campylobacter</i> sp.	1	1,92%

O maior percentual de isolamento da espécie *Campylobacter coli* neste trabalho, corrobora com os resultados encontrados por Andrade e colaboradores (2007), que analisaram por sete anos e publicaram a exatamente 10 anos, um estudo nessa mesma colônia. Apesar da mudança esperada pela rotatividade de indivíduos, e modificações sanitárias implementadas, verifica-se a manutenção deste gênero e preponderância da espécie *C. coli* mostrando que, a redução da carga bacteriana e o controle deste micro-organismo não ocorreu. Andrade e colaboradores, no estudo de 2007, citam ainda, a implementação de medidas de controle sanitário e uma reforma na infraestrutura do setor com objetivo de isolamento dos animais de cada espécie de PNH da criação do ICTB. Estas medidas não só reduziram a contaminação pela bactéria, mas também mantiveram os baixos percentuais ao longo dos anos seguintes do estudo longitudinal. Valores semelhantes foram encontrados nos animais avaliados no presente estudo. Gonçalves e colaboradores (2010) relatam hábito diurno, o sedentarismo e preferência alimentar por frutas dos animais da espécie *Macaca mulatta*, o que reduz o contato com outras fontes de contaminação por *Campylobacter* spp.

De modo geral, a caracterização microbiológica das amostras do painel, com

referência a família Enterobacteriaceae reflete, segundo Guentzel (1996), grande semelhança com o que ocorre na microbiota intestinal humana. Dentro desta família, em apenas uma amostra, foi isolada e identificada uma bactéria potencialmente patogênica (*Yersinia enterocolitica*). O que demonstra que a maioria dos animais avaliados possuía um bom status sanitário.

Quanto ao *Campylobacter* spp., os percentuais encontrados reproduzem o que foi descrito anteriormente na literatura (LAURIA-FILGUEIRAS; HOFER, 1998; LAURIA-FILGUEIRAS, 2000; ANDRADE et al., 2007; CYSNE, 2007) para animais de cativeiro, refletindo novamente a susceptibilidade elevada de *Macaca fascicularis* (aproximadamente 76% das amostras avaliadas) e moderada de *Macaca mulatta* (apenas cerca de 27% das amostras foram positivas). Destacamos que, assim como observado no trabalho de Andrade e colaboradores (2007), nos indivíduos onde ocorreu isolamento de *Campylobacter*, não foi detectado nenhum sintoma clínico grave, sugerindo alguma forma de adaptação dos animais a esse micro-organismo.

Todavia, esta possível simbiose com os primatas estudados, não minimiza o fato de que *Campylobacter* spp. continua presente nestas colônias, possibilitando infecções cruzadas e possível interferência nos procedimentos experimentais. O que reforça mais ainda a necessidade de produção de um teste que possibilite uma rápida triagem dos indivíduos portadores.

6.2. O antígeno imunizante produzido e a inoculação das aves para produção de IgY

6.2.1. Parâmetros de produção do extrato bruto proteico

A figura 6, demonstra a análise complementar físico-química do precipitado de *C. jejuni* no SDS-PAGE após a realização do primeiro processo de rompimento. Foi detectada a presença de grande quantidade de material proteico (colunas 3 e 5) nas

duas concentrações aplicadas. Entretanto, mesmo na coluna 7, com o material mais diluído foi possível ainda detectar a presença de material proteico residual. Na coluna 9, onde foi aplicado o sobrenadante, não foi possível observar presença de nenhum material proteico. Pode-se concluir que este processo de sonicação não foi eficaz no rompimento da parede bacteriana para obtenção de proteínas solúveis no sobrenadante. O segundo processo de sonicação (Figura 7) demonstra a presença de material proteico livre no sobrenadante após rompimento (colunas 3, 5 e 7). A pouca quantidade de material proteico visualizado se justifica pela pouca quantidade de material bacteriano utilizado como partida (somente duas placas de cultivo), sendo observado na dosagem de proteínas totais do sobrenadante pelo kit de quantificação de proteínas totais pelo BCA, 0,2132 mg/mL. Diante desses resultados, foi concluído que o segundo processo apresentou a melhor eficiência para o rompimento da parede bacteriana, e que diante da concentração encontrada, em comparação ao que seria necessário para imunização e experimentos subsequentes, seria necessário um novo inóculo de partida com material de 20 placas semeadas de *C. jejuni*.

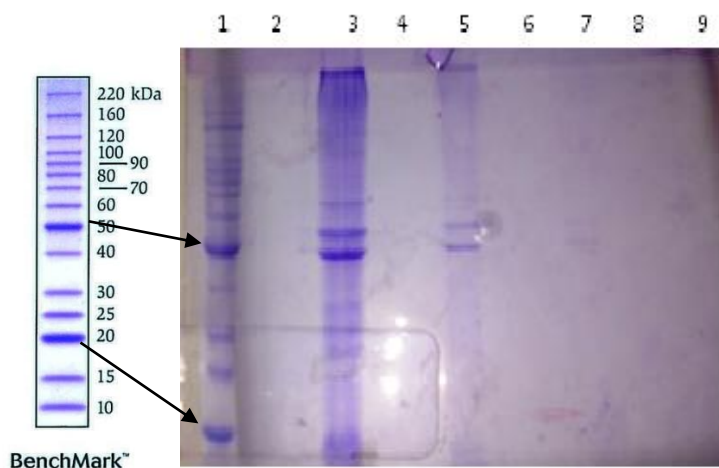


Figura 6: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de *C. jejuni* após primeiro processo de sonicação para obtenção do extrato bruto proteico. A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmarck Protein Ladder); coluna 1-Padrão de peso molecular, coluna 2-vazio, coluna 3-precipitado diluído 1:10, coluna 4-vazio, coluna 5-precipitado diluído 1:100, coluna 6-vazio, coluna 7-vazio e coluna 8-sobrenadante puro

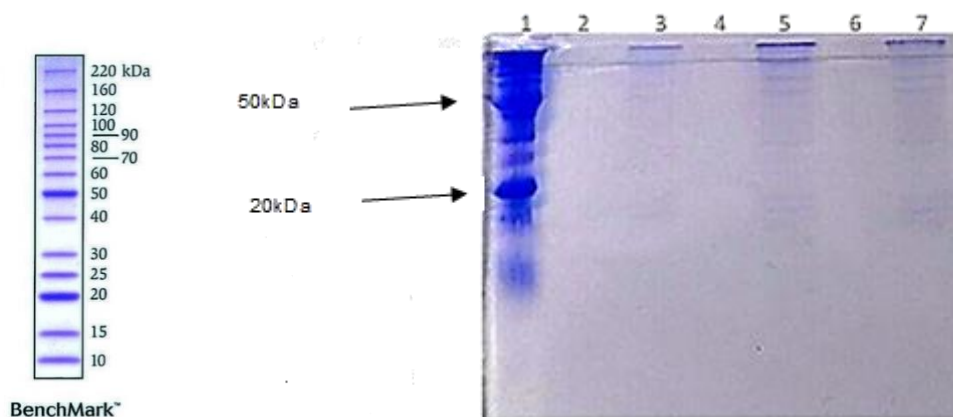


Figura 7: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de *C. jejuni* após segundo processo de sonicação para obtenção do extrato bruto proteico. A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmarck Protein Ladder); coluna 1- Padrão de peso molecular, coluna 2- vazio, coluna 3- sobrenadante 1x, coluna 4- vazio, coluna 5- sobrenadante 2x, coluna 6- vazio, coluna 7- sobrenadante 3x.

A massa do cultivo de 10 placas de *C. jejuni* foi submetida ao segundo processo de sonicação, selecionado anteriormente como o mais eficaz. No SDS-PAGE (Figura 8), na coluna 1 o precipitado apresentou uma quantidade aumentada, em relação ao gel da figura 7, de material proteico. Nas colunas 2 e 3 o sobrenadante demonstrou presença de material proteico ainda em pouca quantidade em relação a massa bacteriana trabalho (20 placas de cultivo).

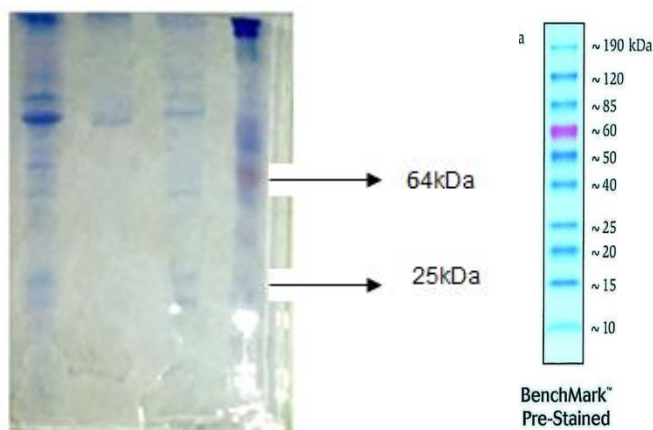


Figura 8: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado e sobrenadante do extrato bruto proteico de *C. jejuni* após sonicação com material de 20 placas. A direita, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmarck Pre-stained Protein Ladder); coluna 1- precipitado puro, coluna 2- sobrenadante 1x, coluna 3- sobrenadante 2x, coluna 4- Padrão de peso molecular.

Buscando melhorar o rendimento para obtenção de proteínas solúveis no sobrenadante e romper a parede bacteriana com maior eficiência, foi utilizado tampão de lise (GREEN; SAMBROOK, 2012). Devido ao aumento da massa bacteriana (10 placas de cultivo) foi aumentado também a quantidade de pulsos de 3 para 5 para o rompimento completo da parede bacteriana. Na avaliação deste processo (Figura 9), foram visualizadas nas colunas 2, 3 e 4 no sobrenadante, a presença de material proteico adequado. O precipitado foi analisado (resultados não mostrados), onde foi possível observar quantidade de material proteico residual, demonstrando que este processo foi eficaz no rompimento da parede bacteriana. E visando melhorar a obtenção das proteínas solúveis foi realizada as lavagens com tampão pbs em ultracentrifugação retirando o máximo de tampão de lise, e permitindo a concentração das proteínas solúveis no sobrenadante. A quantificação de proteína totais sobrenadante foi de 1,1066mg/mL.

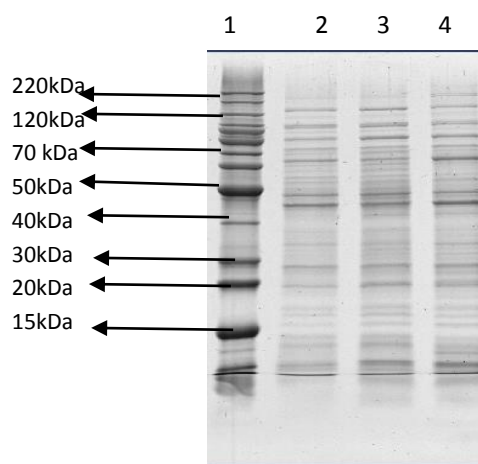


Figura 9: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de *C. jejuni* após segundo processo de sonicação utilizando tampão de lise com diferentes concentrações do sobrenadante. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder), Coluna 1- Padrão de peso molecular, coluna 2- sobrenadante 1x, coluna 3- sobrenadante 2x, coluna 4- sobrenadante 3x.

Com o intuito de obter um imunógeno com menor número de contaminantes, foi realizado um tratamento com solução de detergente (LOGAN; HARRIS; TRUST, 1987), seguido das lavagens em ultracentrifugação para retirada das lipoproteínas que são

menos imunogênicas e dos materiais que poderiam ser tóxicos a ave. Na figura 10, a análise por SDS-PAGE demonstrou na coluna 4 que esse tratamento se mostrou eficaz para purificação do material a ser utilizado para imunização. Na quantificação de proteínas, o material tratado revelou a concentração de 0,6153 mg/mL.

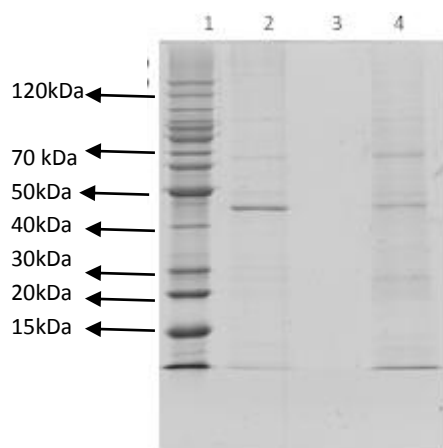


Figura 10: Análise de SDS-PAGE em condições de redução do precipitado de *C. jejuni* após tratamento com detergente. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmarck Protein Ladder), coluna 1- Padrão de peso molecular, coluna 2- sobrenadante não tratado com solução detergente, coluna 3 - vazio, coluna 4- sobrenadante tratado com solução detergente.

6.2.2. Período de inoculação e Produção das Imunoglobulinas Y

6.2.2.1. Acompanhamento Clínico da galinha poedeira

Durante todo o processo experimental foi observado que a ave utilizada permaneceu clinicamente sadia. No processo de imunização, e nos dias subsequentes, não houve alterações, não foram detectadas dor na palpação ou desconfortos e a galinha alimentou-se normalmente. Após a imunização, a galinha permaneceu saudável, com comportamento habitual da espécie, com postura adequada e estável, com média de 1 ovo por dia durante todo período de coleta. Entretanto, em função do calor no ambiente, durante o verão a galinha foi solta, visando evitar a morte e o sofrimento do animal, o

que foi possível por ser um galinheiro particular, visto que, a Fiocruz não possui um biotério de aves.

6.3. Caracreziação das IgYs

6.3.1. Concentração de IgY anti-*C. jejuni* obtida após a extração e sua caracterização por SDS-PAGE:

As concentrações de IgY, após a extração da IgY anti-*C. jejuni* das gemas dos ovos, variaram de 51,05 mg/mL (dia 11) a 0,86 mg/mL (dia 107), com média de 15,52 mg/mL. Como em cada gema o volume final de IgY extraída foi de 2,0 mL, a média de produção foi de 31,04 mg de IgY por gema. A figura 11 apresenta o perfil de produção de IgY ao longo dos 4 meses após a imunização. Foi possível notar que nos dois primeiros meses após a imunização houve um perfil adequado e constante de produção que diminuiu após o terceiro mês, com uma queda ainda maior no quarto mês, em que as coletas foram encerradas. Atribui-se essa queda as elevadas temperaturas ambientais, embora mantivesse quadro clínico saudável com postura natural, também foi observado uma redução no volume da gema. Outra possibilidade seria a necessidade de um booster do imunógeno para ampliar novamente as concentrações da IgYs extraídas.

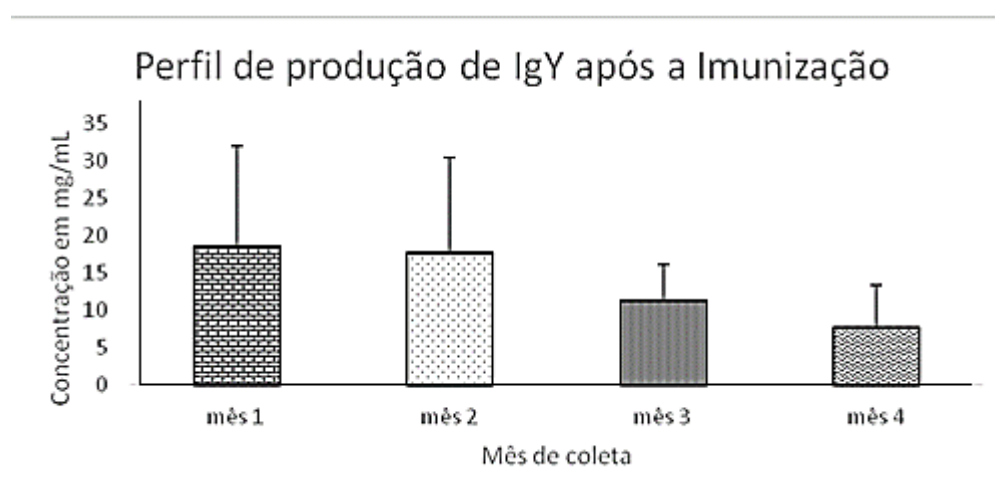


Figura 11: Perfil de produção de IgY após a imunização completa medida por espectrofotometria a 280nm. As barras representam o desvio padrão. Legenda: Colunas mês 1: 18,49 mg/mL; mês 2: 17,73 mg/mL; mês 3: 11,36 mg/mL e mês 4: 7,67 mg/mL .

No SDS-PAGE de algumas amostras de IgY extraídas (Figura 12, colunas de 1 ao 3 e coluna 5) foi possível verificar a presença da cadeia leve (~ 27kDa) e a cadeia pesada (~70kDa) Esses pesos moleculares são descritos por inúmeros trabalhos (POLSON,1980; SCHADE,2005; MINE, 2008; DIRAVIYAM et al., 2014; ZORRIEZHAN et al., 2016). Foi possível detectar ainda, a semelhança do perfil proteico das amostras aplicadas. Acima da cadeia pesada foram visualizados fragmentos (220 a 70 kDa), assim como entre cadeia leve e pesada também foram visualizados fragmentos intermediários (50 e 30 kDa), o que justificou um processo de purificação pela cromatografia por adsorção tiofílica em coluna Hi-Trap® IgY Purification.

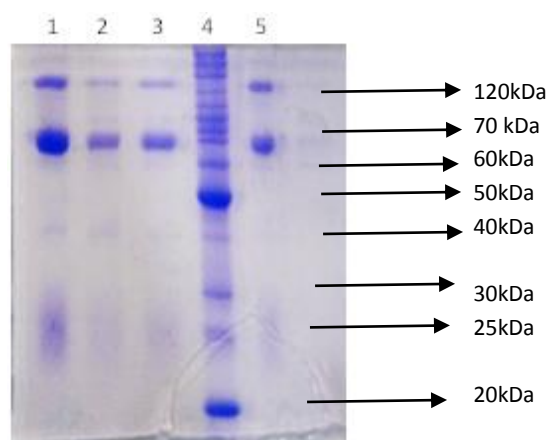


Figura 12: Análise de SDS-PAGE em condições de redução das IgY extraídas utilizando PEG. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (Benchmark Protein Ladder), Coluna 1. IgY Dia de coleta 28; Coluna 2. IgY Dia de coleta 33; Coluna 3. IgY Dia de coleta 36; Coluna 4. Padrão de peso Molecular e Coluna 5. IgY Dia de coleta 44.

6.3.2. Especificidade da IgY extraída anti *C.jejuni* por Western blot

No Western blot (Figura 13), a coluna 1 demonstra que a IgY extraída foi capaz de reconhecer de maneira específica o antígeno imunizante. Foram visualizadas bandas proteicas de 78 até 7,6 kDa. O que demonstra a forte sensibilidade e especificidade da IgY produzida frente a *C. jejuni*. A figura 14, demonstrou que a IgY produzida não

reconheceu espécies bacterianas da família *Enterobacteriaceae* presentes na microbiota intestinal dos PNH (colunas 1 até 6), o que demonstrou a excelente especificidade do imunorreagente. Entretanto, foi possível notar o reconhecimento da IgY produzida pelas proteínas da *C.colli* (coluna 7) o que mostra que houve capacidade de reconhecer também outra espécie diferente da utilizada no antígeno imunizante pertencente ao mesmo gênero bacteriano.



Figura 13: Análise por Western blot da reatividade IgY extraída anti-*C.jejuni* frente a *Campylobacter jejuni*. Legenda: A esquerda esquema de frações do padrão de peso molecular (kalendoscope-Bio-Rad), coluna 1 - *C.jejuni* cepa ATCC33291; coluna 2 - Padrão de peso molecular.



Figura 14: Análise por Western blot da reatividade IgY extraída anti-*C. jejuni* frente a bactérias da microbiota intestinal de PNH e bactérias do gênero *Campylobacter*. Legenda: coluna s: 1. *E. coli* 1; 2. *E. coli* 2; 3. *Proteus vulgaris*; 4. *Proteus mirabilis*; 5. *Yersinia enterocolitica*; 6. *Enterobacter* sp.; 7. *Campylobacter coli*

6.3.3. Especificidade da IgY extraída frente ao antígeno imunizante pelo ELISA

A IgY extraída foi testada nas diluições de 1:10 a $2,19 \times 10^{11}$, frente as concentrações de antígeno imunizante de *C. jejuni* nas diluições 1:25 a $1: 2,19 \times 10^{13}$, utilizando tanto caseína a 1%, 2%, 5% e 10% (leite desnatado Molico-Nestlé®) quanto BSA a 5% e 10% frente as diluições do conjugado anti-IgY (1:1000; 1:8000 e 1:30.000), utilizando os dois reveladores. Os resultados demonstraram que IgY extraída reconhecia o antígeno imunizante devido à elevada leitura por densidade óptica em todos os testes realizados impossibilitando a diferenciação do título real. Entretanto, não foi possível obter resultados repetidos dos testes realizados sugerindo que houvessem impurezas no material, optando-se pela realização da purificação deste imunorreagente utilizando a coluna Hi-Trap® IgY purification, acoplada ao HPLC, para a utilização da testagem com as amostras de PNH.

6.4. Resultados do processo de purificação da IgY e caracterização da IgY purificadas

6.4.1. Resultados do processo de purificação utilizando “Hi-Trap IgY purification”

Para que todo material fosse purificado foram realizadas três corridas de purificação na colula acoplada ao HPLC. No processo de purificação foram gerados cromatogramas (Figuras 15 a 17), um para cada uma das três corridas. O perfil das três corridas foi muito semelhante demonstrando a boa reprodutibilidade do método utilizando a coluna Hi-Trap® IgY Purification acoplada em sistema de HPLC. Nos eletroferogramas das três corridas pôde ser observado três picos: o primeiro pico correspondeu saída das impurezas do material aplicado e uma pequena parte de IgY não ligada, o segundo pico correspondeu a saída da IgY purificada. Já o terceiro pico, correspondeu a compostos lipídicos, liberados na última etapa com aplicação do tampão que contém álcool e que haviam se ligado a coluna de forma inespecífica.

A IgY foi coletada na primeira e na segunda passagem do tubo 3 ao tubo 6, na terceira passagem a coleta foi realizada entre os tubos 3 e 5 (Tabela 6). Na primeira passagem houve um rendimento de 4,28 mg/mL de IgY purificada, na segunda 3,43

mg/mL e na terceira passagem 2,45 mg/mL.

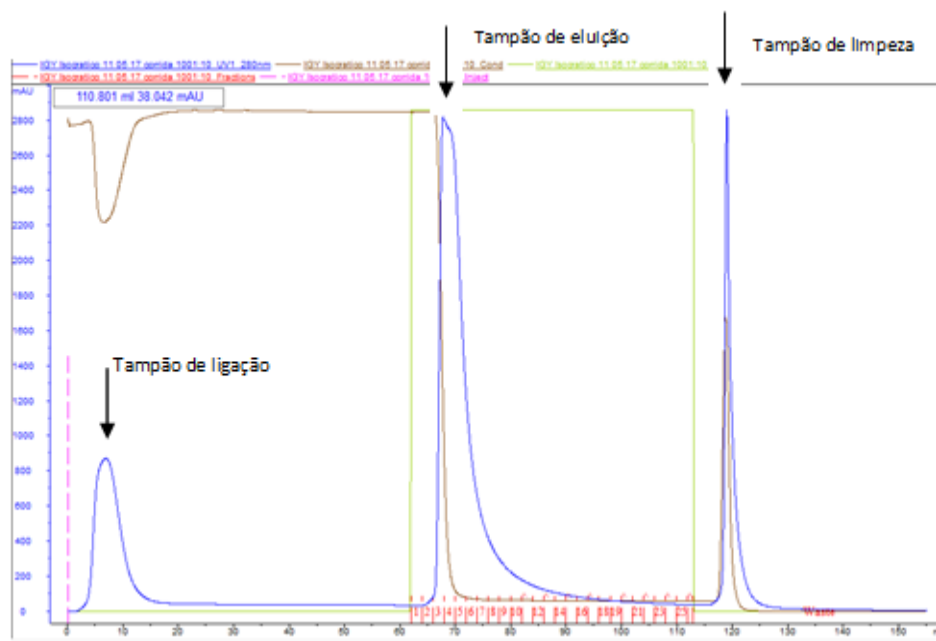


Figura 15: Perfil cromatográfico da IgY utilizando adsorção tiofílica acoplado ao sistema de HPLC da primeira passagem de IgY extraída.

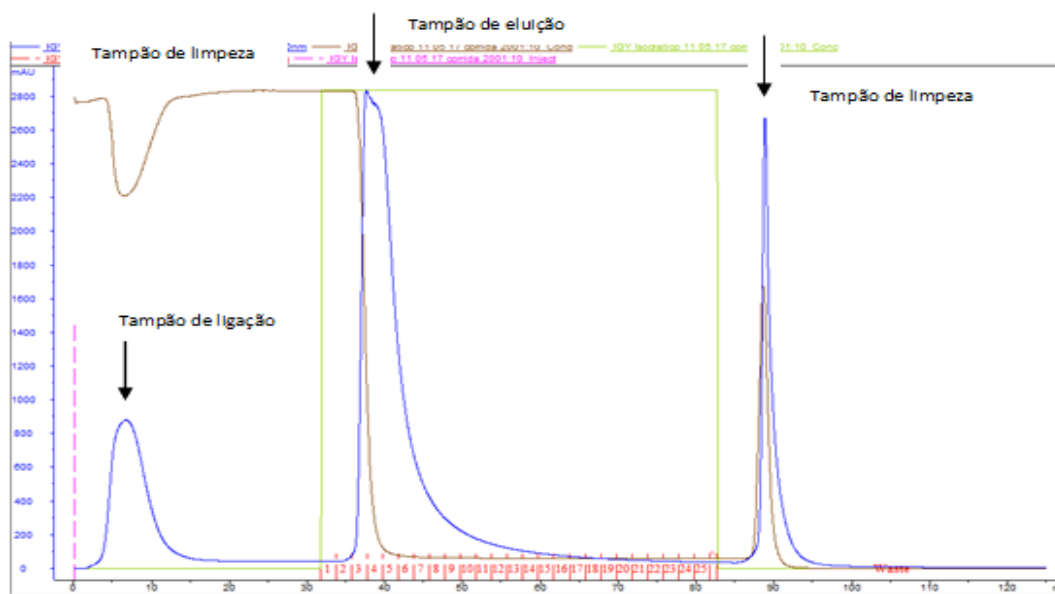


Figura 16: Perfil cromatográfico da IgY utilizando adsorção tiofílica acoplado ao sistema de HPLC da segunda passagem de IgY extraída.

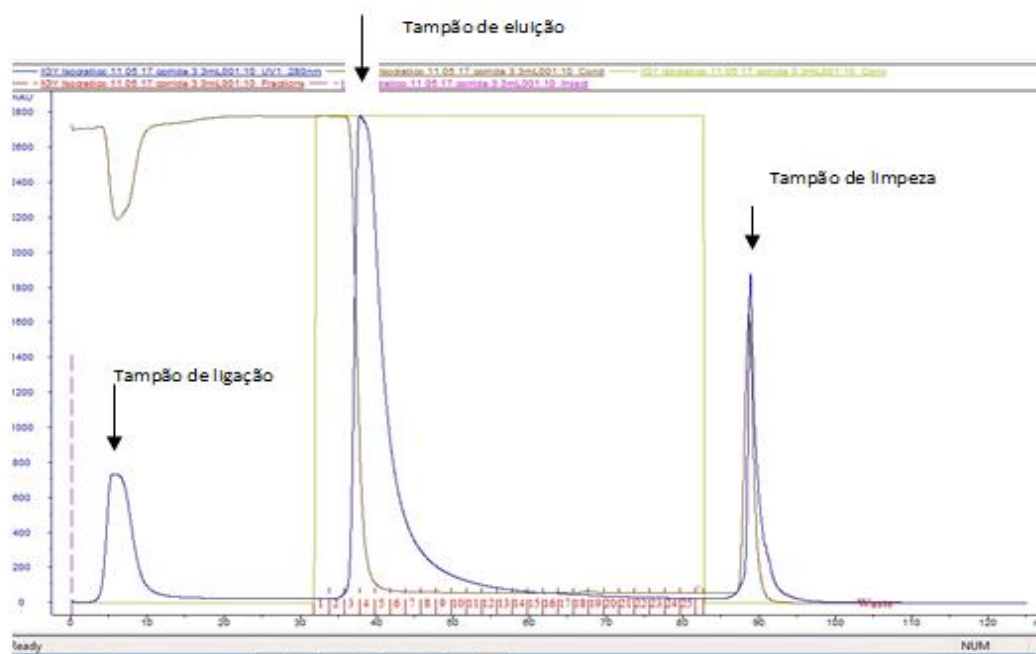


Figura 17: Perfil cromatográfico da IgY utilizando adsorção tiofílica acoplado ao sistema de HPLC da terceira passagem de IgY extraída.

Tabela 7: Leituras em densidade óptica (DO) a 280 nm e concentração de IgY purificada (mg/mL) após as passagens na coluna Hi-Trap® IgY Purification acoplada ao HPLC.

AMOSTRA	LEITURA	CONC.(mg/m)	
3C1	0,015	1,1278	} Coleta de IgY purificada
4C1	0,166	12,4812	
5C1	0,041	3,0827	
6C1	0,006	0,4511	
7C1	0	0,0000	
8C1	-0,005	-0,3759	
3C2	0,005	0,3759	} Coleta de IgY purificada
4C2	0,13	9,7744	
5C2	0,042	3,1579	
6C2	0,006	0,4511	
7C2	0	0,0000	
8C2	-0,006	-0,4511	
3C3	0,005	0,3759	} Coleta de IgY purificada
4C3	0,071	5,3383	
5C3	0,022	1,6541	
6C3	-0,003	-0,2256	
7C3	-0,004	-0,3008	
8C3	-0,01	-0,7519	

6.4.2. Resultado da caracterização físico-química por SDS-PAGE da IgY purificada por Hi-Trap® IgY Purification

O SDS-PAGE da IgY purificada em condições de redução é mostrado na figura 16. A coluna 1 mostra a IgY purificada, com um perfil semelhante ao apresentado anteriormente, a cadeia pesada da IgY apresentando (~70kDa), enquanto a cadeia leve (~ 27kDa). A diminuição de bandas acessórias pôde ser visualizada. Entretanto, foi verificada a presença de fragmentos entre 40 e 20 kDa ainda não eliminadas mesmo após o processo de purificação. Esses fragmentos foram descritos em 2006, por Klimentzou e colaboradores sendo chamadas de pequenas impurezas correspondentes ao peso molecular cerca de 35 kDa (provavelmente o fragmento C-terminal do precursor da vitelogenina II).

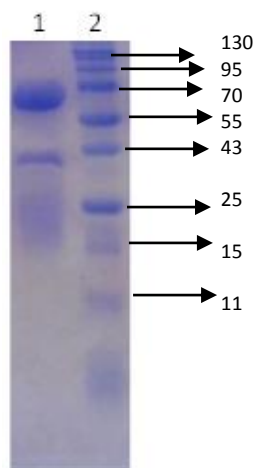


Figura 18: Análise de SDS-PAGE em condições de redução da IgY purificada utilizando PEG. Legenda: A esquerda, esquema das frações do padrão de peso molecular (BenchMarck protein ladder), coluna 1: IgY purificada, coluna 2: Padrão de Peso Molecular.

6.4.3. Verificação da especificidade da IgY purificada anti-*C.jejuni* por Western blot

No Western blot (Figura 19), a coluna 9 demonstra que a IgY purificada foi capaz de reconhecer de maneira específica o antígeno imunizante. Foram visualizadas bandas proteicas de 75 até 15 kDa. O que demonstra a forte sensibilidade e especificidade da IgY purificada frente a *C. jejuni* (coluna 9). A figura 12, demonstrou que a IgY purificada não reconheceu espécies bacterianas da família Enterobacteriaceae presente na microbiota intestinal de PNH (colunas 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 10) o que mostra a excelente especificidade do imunorreagente. Entretanto, foi possível notar o reconhecimento da IgY produzida a *C. coli* (coluna 8). Diante disto pudemos observar que a IgY produzida não foi capaz de reconhecer somente a espécie utilizada como antígeno imunizante (*C. jejuni*), mas foi capaz de reconhecer outra espécie (*C. coli*) pertencente ao gênero bacteriano. Foi notado ainda, que a IgY purificada foi capaz de reconhecer mais frações proteicas do gênero *Campylobacter* quando comparado ao reconhecimento da IgY extraída (Figura 19) demonstrando que o processo de purificação foi capaz de retirar os interferentes que diminuía o reconhecimento das proteínas do gênero *Campylobacter* e dos antígenos usados para a imunização. As duas espécies de *Campylobacter* são muito semelhantes com pequenas diferenças que vão da quantidade de expressão das proteínas que contém no flagelo (para a *C. coli*-principal flagelina B e para *C. jejuni* –a principal é flagelina A) e nas provas bioquímicas de identificação onde as da espécie *C.jejuni* são positivas para a hidrólise do hipurato e a *C. coli* não.

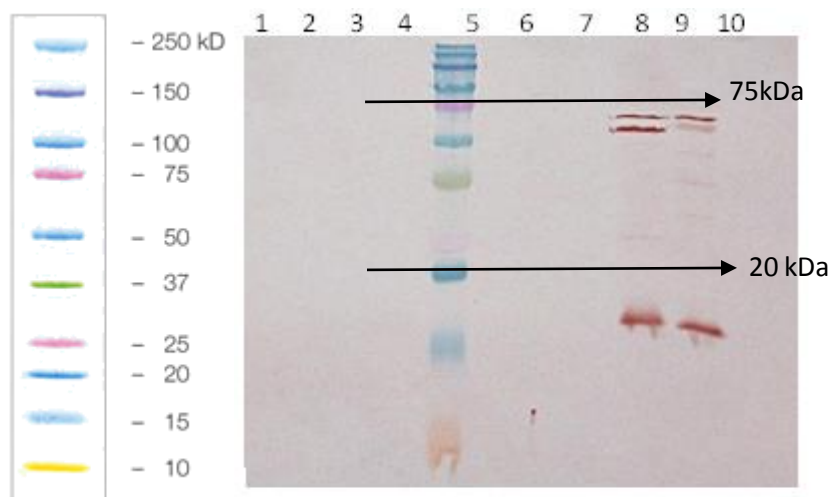


Figura 19: Análise por Western blot da reatividade IgY extraída anti-*C. jejuni* frente a bactérias da microbiota intestinal de PNH e bactérias do gênero *Campylobacter*. Legenda: A esquerda, esquema das frações de peso molecular (kalendoscope Bio-rad); coluna 1. *E. coli* 1; coluna 2. *E. coli* 2; coluna 3. *Proteus vulgaris*; coluna 4. *Proteus mirabilis*; coluna 5. Padrão de peso molecular; coluna 6. *Yersinia enterocolitica*; coluna 7. *Enterobacter* sp.; coluna 8. *Campylobacter coli*; coluna 9. *Campylobacter jejuni* coluna 10 .vazia

6.5. Especificidade e afinidade dos antígenos de *C. jejuni* pela IgY nas amostras de fezes e de lavado da ampola retal por ELISA indireto.

6.5.1. Avaliação dos parâmetros para utilização do ELISA com a IgY anti-*Campylobacter* spp. *in house*.

Foram utilizados, inicialmente, os seguintes parâmetros: duas amostras de LAR positivas e duas negativas, na cultura, puras e diluídas 1:10 no tampão de fixação na placa, utilizando bloqueio com 1% de leite, IgY diluída a 1:250, 1:500 e 1:1000 e com diluição de 1:8000 de conjugado (parâmetro a utilizada na realização do Western blot) e solução de TMB como revelador. Com estes parâmetros foi possível observar que as amostras utilizadas puras apresentavam leituras inferiores em relação as diluídas em tampão, definindo ser necessária a sua utilização. As diluições de IgY (1:250 e 1:500) utilizadas não foram capazes diferenciar amostras negativas e positivas, já que apresentaram leituras em densidade óptica muito semelhantes (DO das amostras positivas

0.106 e 0.145 e negativas 0,083 e 0.153). A partir de então a diluição 1:1000 de IgY foi definida para ser utilizada, pois foi a que melhor diferenciou as amostras positivas e negativas (DO positiva 0,231 e negativa.155), tanto puras quanto as diluídas.

Com objetivo de aprimorar o teste, ampliando a diferença de leitura entre amostras positivas e negativas, o ensaio foi repetido com novas diluições das 1:10, 1:20, 1:40 e ampliado o número de amostras de LAR positivas e negativas na cultura, A diferença entre as leituras das amostras positivas e negativas foi pequena, com as leituras baixas(menores que 0.140 para as negativas e que 0.200 para as positivas), por este motivo, este ensaio foi repetido nas mesmas condições, com a inclusão de amostras de fezes humanas como controles negativos. As amostras de fezes humanas apresentaram leituras de DO baixas (entre 0.058 e 0.063), bem próximas das leituras do branco, e as amostras de lavado na diluição 1:10 apresentaram leituras maiores (entre 0.122 e 0.153) que os controles negativos humanos diferenciando de forma adequada estes dois grupos. Este teste foi reproduzido com resultados semelhantes num ensaio posterior (dados não apresentados).

Com o intuito de obtenção de controles confiáveis que comprovem o funcionamento do teste, foi introduzido como controle positivo, associado aos parâmetros anteriores. Como controle positivo foi adicionado o cultivo de *C. jejuni* lisado 1:10, 1:20 e 1:40. As diluições de 1:20 e 1:40 foram diluições que obtiveram as maiores leituras, se diferenciando dos controles negativos, demonstrando ainda, a capacidade da IgY purificada produzida reconhecer o micro-organismo em cultivo utilizado neste ensaio. A repetição obteve os resultados semelhantes. Finalizando a fixação dos seguintes parâmetros para realizar o teste com as amostras do painel de PNH: como controle negativo (fezes humanas 0,025 mg/mL), como controle positivo (lisado de *C. jejuni* nas diluições de 1:20 e 1:40 e duas amostras de LAR positivas no cultivo diluídas 1:10), IgY como anticorpo primário 1:1000, e IgY anti-peroxidase 1:8000, com 20 minutos de revelação com TMB.

6.5.2. Aplicação das amostras do painel no ELISA contendo a IgY anti-*Campylobacter* spp. purificadas (*in house*)

Ao aplicar o teste nas 29 amostras (50% da colônia) de LAR de cynomolgus no teste, o resultado obtido em relação ao ponto de corte (média+2 desvios padrão-95% das amostras) foi de 22 amostras positivas e 7 amostras negativas. Já ao aplicar o teste nas 7 amostras de fezes, o resultado obtido em relação ao ponto de corte (média+2 desvios padrão) foi de 5 amostras positivas e 2 amostras negativas.

Ao aplicar o teste nas 51 amostras (10% da colônia) de LAR de Rhesus, o resultado obtido em relação ao ponto de corte (média+2 desvios padrão) foi de 25 amostras positivas e 26 amostras negativas. Já ao aplicar o teste nas 10 amostras de fezes, o resultado obtido em relação ao ponto de corte (média+2 desvios padrão) foi de 7 amostras positivas e 3 amostras negativas.

Considerando o resultado reunindo as 80 amostras de LAR das duas espécies do gênero *Macaca*, o resultado obtido em relação ao ponto de corte (média+2 desvios padrão) foi de 48 amostras positivas e 32 amostras negativas. Já ao aplicar o teste nas 17 amostras de fezes, o resultado obtido em relação ao ponto de corte (média+2 desvios padrão) foi de 14 amostras positivas e 3 amostras negativas. Estes parâmetros de resposta não podem ser comparados a outros testes imunoenzimáticos, pois não foi encontrado na literatura testes que utilizem este tipo de amostra clínica (Figuras 20-22).

Placa 1 de LAR					
amostra	leitura 1	leitura 2	média	Resultado microbiologia	Resultado Elisa
Cyno1	0,128	0,113	0,1205	<i>Campylobacter</i> sp.	Positivo
Cyno2	0,122	0,129	0,1255	<i>Campylobacter jejuni</i>	Positivo
Cyno3	0,149	0,135	0,142	<i>Campylobacter jejuni</i>	Positivo
Cyno4	0,144	0,134	0,139	<i>Campylobacter jejuni</i>	Positivo
Cyno5	0,149	0,135	0,142	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno6	0,191	0,142	0,1665	sem crescimento	Positivo
Cyno7	0,163	0,137	0,15	sem crescimento	Positivo
Cyno8	0,237	0,268	0,2525	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo

Placa 1 de LAR (cont.)					
amostra	leitura 1	leitura 2	média	resultado microbiologia	resultado ELISA
Cyno9	0,166	0,116	0,141	negativo	Positivo
Cyno10	0,074	0,075	0,0745	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Cyno11	0,164	0,147	0,1555	<i>Campylobacter sp.</i>	Positivo
Cyno12	0,255	0,119	0,187	negativo	Positivo
Cyno13	0,093	0,069	0,081	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Cyno14	0,121	0,088	0,1045	negativo	Positivo
Cyno15	0,202	0,155	0,1785	negativo	Positivo
Cyno16	0,161	0,109	0,135	negativo	Positivo
Cyno17	0,11	0,079	0,0945	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Cyno18	0,117	0,08	0,0985	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Cyno19	0,119	0,091	0,105	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno20	0,223	0,19	0,2065	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno21	0,16	0,112	0,136	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno22	0,128	0,151	0,1395	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno23	0,164	0,169	0,1665	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno24	0,248	0,268	0,258	<i>Campylobacter jejuni</i>	Positivo
Cyno25	0,203	0,275	0,239	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno26	0,133	0,125	0,129	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Cyno27	0,089	0,074	0,0815	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Cyno28	0,112	0,079	0,0955	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Cyno29	0,107	0,088	0,0975	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Rhesus 41	0,164	0,144	0,154	sem crescimento	Positivo
Rhesus 42	0,269	0,138	0,2035	negativo	Positivo
Rhesus 43	0,199	0,182	0,1905	sem crescimento	Positivo
Rhesus 44	0,096	0,116	0,106	<i>Campylobacter coli</i>	Positivo
Rhesus 45	0,081	0,075	0,078	sem crescimento	negativo
Rhesus 46	0,0144	0,147	0,0807	sem crescimento	negativo
Rhesus 47	0,16	0,119	0,1395	sem crescimento	Positivo
Rhesus 48	0,152	0,069	0,1105	sem crescimento	Positivo
Rhesus 49	0,127	0,088	0,1075	sem crescimento	Positivo
Rhesus 50	0,13	0,155	0,1425	sem crescimento	Positivo
Rhesus 51	0,183	0,109	0,146	sem crescimento	Positivo

controles negativos	leitura 1	leitura 2	média	resultado microbiologia	resultado ELISA
f1	0,079	0,078	0,0785	negativo	negativo
f2	0,061	0,073	0,067	negativo	negativo
f3	0,078	0,094	0,086	negativo	negativo
ponto de corte		0,098			

Figura 20: Quadro de resultado das amostras de Lar na placa 1 no ELISA

Placa 2 de LAR					
amostra	leitura 1	leitura 2	média	resultado microbiologia	resultado ELISA
Rhesus 1	0,057	0,09	0,0735	<i>Campylobacter jejuni</i>	negativo
Rhesus 2	0,058	0,067	0,0625		negativo
Rhesus 3	0,062	0,059	0,0605	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Rhesus 4	0,168	0,154	0,161		positivo
Rhesus 5	0,155	0,164	0,1595		positivo
Rhesus 6	0,325	0,325	0,325		positivo
Rhesus 7	0,247	0,199	0,223	<i>Campylobacter coli</i>	positivo
Rhesus 8	0,084	0,081	0,0825	sem crescimento	negativo
Rhesus 9	0,064	0,062	0,063	negativo	negativo
Rhesus 10	0,125	0,16	0,1425	sem crescimento	positivo
Rhesus 11	0,141	0,148	0,1445	negativo	positivo
Rhesus 12	0,072	0,072	0,072	<i>Campylobacter coli</i>	negativo
Rhesus 13	0,093	0,105	0,099	<i>Campylobacter jejuni</i>	negativo
Rhesus 14	0,077	0,079	0,078	negativo	negativo
Rhesus 15	0,124	0,114	0,119	<i>Campylobacter jejuni</i>	negativo
Rhesus 16	0,184	0,19	0,187	<i>Campylobacter coli</i>	positivo
Rhesus 17	0,21	0,178	0,194	negativo	positivo
Rhesus 18	0,149	0,155	0,152	<i>Campylobacter jejuni</i>	positivo
Rhesus 19	0,254	0,208	0,231	negativo	positivo
Rhesus 20	0,205	0,303	0,254	negativo	positivo
Rhesus 21	0,175	0,161	0,168	<i>Campylobacter jejuni</i>	positivo
Rhesus 22	0,148	0,143	0,1455	sem crescimento	positivo
Rhesus 23	0,097	0,119	0,108	negativo	negativo
Rhesus 24	0,114	0,094	0,104	negativo	negativo
Rhesus 25	0,067	0,071	0,069	negativo	negativo
Rhesus 26	0,074	0,107	0,0905	negativo	negativo
Rhesus 27	0,064	0,068	0,066	negativo	negativo
Rhesus 28	0,089	0,139	0,114	negativo	negativo
Rhesus 29	0,056	0,064	0,06	negativo	negativo
Rhesus 30	0,071	0,084	0,0775	negativo	negativo

Placa 2 de LAR (cont.)					
amostra	leitura 1	leitura 2	média	Resultado microbiologia	Resultado ELISA
Rhesus 31	0,052	0,05	<i>0,051</i>	negativo	negativo
Rhesus 32	0,076	0,063	<i>0,0695</i>	negativo	negativo
Rhesus 33	0,074	0,114	<i>0,094</i>	negativo	negativo
Rhesus 34	0,051	0,052	<i>0,0515</i>	negativo	negativo
Rhesus 35	0,172	0,167	<i>0,1695</i>	negativo	negativo
Rhesus 36	0,262	0,263	<i>0,2625</i>	negativo	negativo
Rhesus 37	0,097	0,179	<i>0,138</i>	negativo	negativo
Rhesus 38	0,179	0,209	<i>0,194</i>	negativo	negativo
Rhesus 39	0,061	0,076	<i>0,0685</i>	sem crescimento	negativo
Rhesus 40	0,061	0,115	<i>0,088</i>	sem crescimento	negativo

Controles negativos	leitura 1	leitura 2	média	Resultado microbiologia	Resultado ELISA
f1	0,079	0,074	<i>0,0765</i>	negativo	negativo
f2	0,121	0,099	<i>0,11</i>	negativo	negativo
f3	0,061	0,06	<i>0,0605</i>	negativo	negativo

Figura 21:Quadro de resultado das amostras de Lar na placa 2 no ELISA

Placa de fezes					
amostra	leitura 1	leitura 2	média	Resultado microbiologia	Resultado ELISA
Cyno 4	0,161	0,142	0,1515	positivo	positivo
Cyno 5	0,343	0,316	0,3295	positivo	positivo
Cyno 6	0,254	0,225	0,2395	negativo	positivo
Cyno 7	0,179	0,149	0,164	negativo	positivo
Cyno 8	0,102	0,066	0,084	positivo	positivo
Cyno 9	0,07	0,067	0,0685	negativo	negativo
Cyno 10	0,111	0,086	0,0985	positivo	positivo
Rhesus 2	0,082	0,112	0,097	negativo	positivo
Rhesus 3	0,064	0,119	0,0915	positivo	positivo
Rhesus 4	0,177	0,203	0,19	negativo	positivo
Rhesus 5	0,077	0,108	0,0925	negativo	positivo
Rhesus 6	0,063	0,109	0,086	negativo	positivo
Rhesus 7	0,049	0,044	0,0465	positivo	negativo
Rhesus 8	0,081	0,144	0,1125	negativo	positivo
Rhesus 9	0,058	0,103	0,0805	negativo	positivo
Rhesus 39	0,083	0,133	0,108	negativo	positivo
Rhesus 40	0,041	0,13	0,0855	positivo	positivo

Figura 22: Quadro de resultado das amostras de fezes no ELISA

6.5.3. Relação entre os resultados de microcultivo e do ELISA das amostras do painel

Ao comparar os resultados obtidos, em todas as amostras de LAR do painel nas duas metodologias, os seguintes valores foram encontrados: co-positividade de 59% (20/34); co-negatividade de 39% (18/46). Já se a comparação for por espécies, as amostras de LAR da espécie *M. fascicularis* (cynomolgus) obtiveram a co-positividade de 68% (15/22) e a co-negatividade de 0% (0/7) e as amostras de LAR de *M. mulata* (rhesus) obtiveram a co-positividade de 42% (5/12); co-negatividade de 46% (18/39) (Tabela 8).

De forma geral, 28 das 46 amostras negativas para o cultivo provenientes do LAR, se mostraram positivas no ELISA.

Estes resultados levaram ao surgimento de questões. Uma das mais relevantes seria a possibilidade de amostras negativas no cultivo, que é o teste ouro (BRASIL, 2011), poderem ser positivas no teste ELISA sem estarmos frente a um falso positivo. Para essa demanda, a literatura descreve vários episódios onde o *Campylobacter* está presente e não é possível cultivá-lo, seja nos casos de bactérias viáveis, mas não cultiváveis ou mesmo, micro-organismos já mortos, que ainda se encontram presentes no material (BHAVSAR; KAPADNIS, 2006; OLIVER, 2005; THOLOZAN et al., 1999; ROLLINS; COLWELL, 1986) e que a sua presença pode ser detectada pelo anticorpo (SAILS et al., 2002).

Em contrapartida de 34 amostras de LAR positivas no cultivo, apenas 20 amostras foram positivas no ELISA (co-positividade), evidenciando a possibilidade de dificuldade de detecção dos antígenos nestas amostras. Como é a primeira vez que se utiliza amostras de LAR em um estudo desta natureza, não encontramos na literatura relatos de amostras deste tipo, que são positivas no cultivo e negativas nos testes ELISA.

Buscando verificar se os resultados seriam semelhantes aos encontrados no Lavado (LAR), os parâmetros foram repetidos com as amostras de fezes obtidas para o painel, que foram então diluídas na mesma concentração do controle negativo humano (0,025 mg/mL). Comparando os resultados de todas as amostras de fezes reunidas com os do cultivo bacteriológico, foi encontrado 86% (6/7) de co-positividade e 23% (2/10) de co-negatividade (Tabela 8). Em contrapartida, se a comparação for realizada em função da espécie de primata, as amostras de fezes de *Cynomolgus* obtiveram 100% (4/4) de co-positividade e 33% (1/3) de co-negatividade. Por outro lado, as amostras de fezes de Rhesus, obtiveram 66% (2/3) de co-positividade e 14% (1/7) de co-negatividade (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros de concordância bruta entre os testes realizados e o resultado do teste padrão ouro.

LAR de	Percentual (%)	Fezes de	Percentual (%)
<i>Macaca fascicularis</i>		<i>Macaca fascicularis</i>	
Co-Positividade	68	Co-Positividade	100
Co-negatividade	0	Co-negatividade	33
LAR de	Percentual (%)	Fezes de	Percentual (%)
<i>Macaca mulatta</i>		<i>Macaca mulatta</i>	
Co-Positividade	42	Co-Positividade	66
Co-negatividade	46	Co-negatividade	14
LAR das duas	Percentual (%)	Fezes das duas	Percentual (%)
espécies		espécies	
Co-Positividade	59	Co-Positividade	86
Co-negatividade	39	Co-negatividade	23

Considerando os parâmetros de concordância bruta, e as duas metodologias utilizadas (Cultivo e ELISA), foi possível observar que os resultados obtidos são melhores para as amostras de fezes que para o LAR.

A avaliação das amostras de fezes corroborou com o que foi observado nas amostras do LAR, onde um número expressivo de amostras negativas no cultivo, se mostraram positivas no ELISA (10/8). Esse fato confirma o que é descrito em vários trabalhos de pesquisa, já que algumas bactérias não chegam ao Laboratório em condições viáveis ao cultivo (BHAVSAR; KAPADNIS, 2006; OLIVER, 2005; THOLOZAN et al., 1999; ROLLINS, COLWELL; 1986), mas a sua presença pode ser detectada pelo anticorpo.

Um dado extremamente interessante observado, foi a diferença ocorrida entre a análise dos resultados de LAR e Fezes no que concerne a co-positividade nos dois testes (ELISA e cultura). Nas amostras de fezes obtidas de primatas utilizadas neste

estudo, de 7 amostras positivas no cultivo, 6 amostras também foram positivas no ELISA, evidenciando a melhor performance deste teste neste tipo de amostra.

A partir destes dados, verificamos que o desempenho do teste para estas amostras está comprometido. O INMETRO (2017) define como seletividade o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Visto o desempenho do teste nas amostras de fezes (figura 22) afirmamos que o teste desenvolvido é seletivo. Entretanto, a matriz pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Adicionalmente a magnitude desse efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2017). Seguindo este raciocínio foi possível supor que as amostras de LAR possuíam algum interferente para a sua utilização no ELISA. Com objetivo de avaliar o efeito de interferente, realizamos o teste com a dopagem das amostras, que é semelhante ao estudo do efeito matriz (INMETRO; 2017), uma forma de avaliar a determinação do efeito matriz, aplicando o teste de dopagem. Os resultados foram demonstrados na figura 23. Nela é possível observar que há uma redução na média da leitura da absorbância em relação a média de leitura do controle positivo. Para as amostras de *Macaca fascicularis* a redução foi de 0,256 (50,59%) e para *Macaca mulatta* 0,312 (61%). Demonstrando a ação dos interferentes destas amostras de LAR, que inviabilizam a sua utilização como amostra ao método de ELISA. O que indica que apesar de facilitar a coleta individual do material nos primatas, o LAR não é uma boa amostra para a realização deste ensaio, pois possuem elementos que reduzem a leitura gerando falso negativos em relação ao teste padrão ouro.

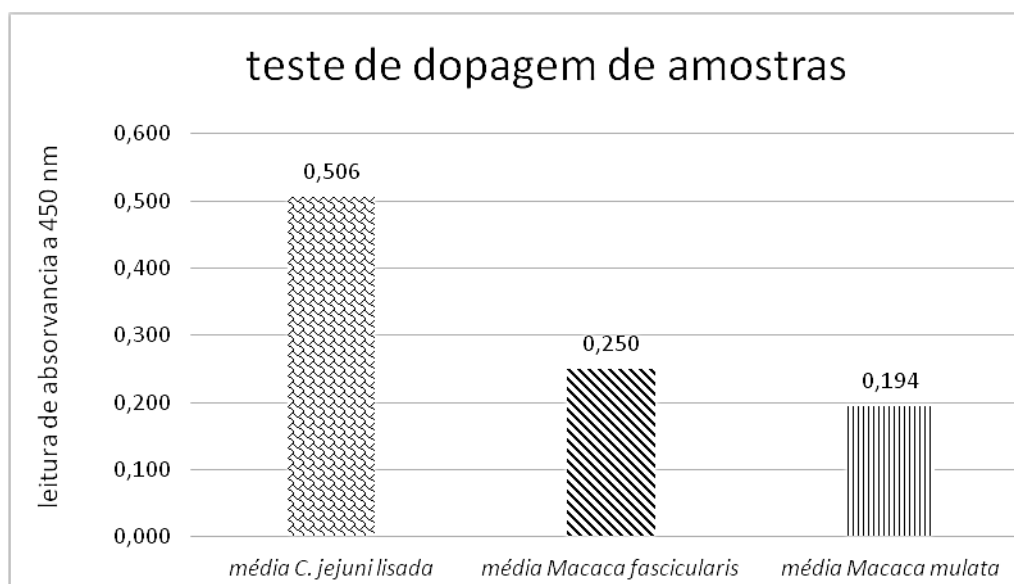


Figura 23: Gráfico referente ao ELISA com dopagem das amostras de LAR. Na primeira coluna, média da leitura da Bactéria pura lisada, na segunda coluna, média das leituras dos LARs de *Macaca fascicularis* acrescidos de bactéria do controle e na terceira coluna, a média das leituras dos LARs de *Macaca mulatta* acrescidos de bactéria do controle.

Os experimentos realizados até este momento, não permitem definir quais seriam estes interferentes. Segundo Tate e Ward (2004) várias são as substâncias que podem causar interferência em testes de ELISA. Com base nisso, podemos inferir que espécimes clínicos como LAR, que são concentrados para a utilização, podem conter maior quantidade desse tipo de interferentes, já que nas fezes *in natura*, ocorre em contrapartida, uma diluição do material antes da análise pelo ELISA.

7. Conclusões

- Com base na metodologia utilizada foi possível construir um painel de amostras fecais dos primatas e identificar não só *Campylobacter* spp. mas também membros da família Enterobacteriaceae pertencentes a microbiota dos PNH, como também uma espécie potencialmente patogênica desta família.
- Observou-se a manutenção da maior incidência de *Campylobacter* spp. em *Macaca fascicularis* dentro da criação do ICTB.

- Foi obtido a partir de imunização de galinhas com cepa padrão ATCC, anticorpo IgY específico capaz de detectar espécies do gênero *Campylobacter*.
- O Western blot utilizando as bactérias isoladas do painel de amostras fecais, confirmou a capacidade do reconhecimento pela IgY não só de antígenos específicos de *C. jejuni*, mas também de outras espécies do gênero.
- Devido ao número exíguo de fezes de PNH obtidas no manejo, e à interferência de substâncias presentes nas amostras de LAR não foi possível determinar a especificidade do Teste de ELISA indireto.
- As amostras de LAR demonstraram conter substâncias capazes de gerar interferência na leitura da absorbância evidenciando não ser um material adequado para a análise por ELISA.
- A utilização de fezes no teste de ELISA, que utilizou a IgY purificada, permitiu melhor desempenho que o LAR, possibilitando melhor detecção de *Campylobacter* sp., sendo o material indicado para um teste diagnóstico para PNH.
- Foi possível, com base na política dos 3Rs, obter um anticorpo específico e potencialmente utilizável em outros testes/pesquisas, com apenas um animal, sem sofrimento ou eutanásia do mesmo, contribuindo para a ciência dos animais de laboratório no Brasil.

8. PERSPECTIVAS

- Buscar produzir um antígeno recombinante específico de *C. jejuni* visando a produção de IgY com a finalidade de refinar o teste utilizado.
- Ajustar as condições adequadas a IgY purificada para determinar seus limites de detecção;

- Construir um ELISA sanduíche para pesquisa de coproantígenos de *C.jejuni* em fezes de PNH.
- Buscar metodologias que possam reduzir as quantidade de interferentes nos LARs com objetivo de viabilizar a sua utilização para monitoramento do status sanitário da colônia.

9. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B.; PAN AMERICAN SANITARY BUREAU. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals = Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. In: [s.l.] **Pan American Health Organization**. Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization, 2005.

ALVES, M. B. R.; FONSECA, B.B.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; NALEVAIKO, P.C.; GIRÃO, L.C.; MONTEIRO, G.P.; SILVA, P.L.; ROSSI, D.A. Feed can be a source of *Campylobacter jejuni* infection in broilers. **British Poultry Science**, v. 58, n. 1, p. 46–49, fev. 2017.

ANDRADE, M.C.R. Principais doenças de primatas não-humanos. In: ANDRADE, A. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fio-cruz, 2002. P.155-65

ANDRADE, M. C. R. GABEIRA, S.C.O; ABREU-LOPES, D; ESTEVES, W.T.C.; VILARDO, M.C.B; THOMÉ, J.D.S, CABELLO, P.H, LAURIA-FILGUEIRAS, A.L. Circulation of *Campylobacter* spp. in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) held in captivity: a longitudinal study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 53–57, fev. 2007.

BAILEY, M. T.; COE, C. L. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. **Developmental Psychobiology**, v. 35, n. 2, p. 146–155, set. 1999.

BARDOS, L. **Carotenoids and body defense in accordance with experiences on poultry**. In book: RISK FACTORS AND BIOLOGICAL SYSTEMS, Publisher: SLOVAK UNIV. OF AGRIC. IN NITRA, Editors: LUCAC, N, AND MASSANYI, P, pp.114-124. Jan. 2011.

BAZE, W. B.; BERNACKY, B. J. *Campylobacter*-induced fetal death in a rhesus monkey. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 605–607, set. 2002.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. (EDS.). Group2: Aerobic/microaerobic motile, helical/vibrioid gram negative bacteria. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed., [Nachdr.] ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 41.

BESSÈDE, E.; DELCAMP, A.; SIFRÉ, E.; BUISSONNIÈRE, A.; MÉGRAUD, F. et al. New methods for detection of *Campylobacter* in stool samples in comparison to culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 941–944, mar. 2011.

BHAVSAR, S.; KAPADNIS, B. *Virulence factors of Campylobacter*. **The Internet Journal of Microbiology**. Volume 3 Number 2, 2006.

BRASIL. Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Presidência [da] República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos**, Brasília, DF, 8 out. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 21 nov. 2017.

BRASIL, 2011. Ministério da Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de Campylobacter**. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-Campylobacter.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2016.

CCAC, C. C. ON A. C. **Guidelines on: antibody production**, 2002. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2016.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Waterborne, and Environmental Diseases. **Campylobacter**, 3 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>>. Acesso em: 9 fev. 2016.

CLEMMONS, E. A.; JEAN, S.M.; MACHIAH, D.K.; BREDING, E.; SHARMA, P. Extrainestinal campylobacteriosis in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Comparative Medicine**, v. 64, n. 6, p. 496–500, dez. 2014.

CHALGHOUMI, R.; MARCQ,C.; THÉWIS,A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Effects of feed supplementation with specific hen egg yolk antibody (immunoglobulin Y) on *Salmonella* species cecal colonization and growth performances of challenged broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 10, p. 2081–2092, 1 out. 2009.

CONCEA. **Primatas não humanos mantidos em cativeiro para atividades de ensino ou pesquisa científica**, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.sbppc.org.br/arq/CONCEA-consulta-publica-marco-2015-Primatas-nao-humanos.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de Enterobactérias**. Instituto Oswaldo Cruz, 1972.

CRUZ, P.B.; Santos, F. N.; Esteves, W. T. C.; Abrantes, J. A.; Cysne, L. B.; Pinto, A. C. A.; Oliveira, D.R.A.; da Silva, F. A.; Nogueira, J. M. R. Pesquisa de microbiota normal e de bactérias potencialmente patogênicas em material fecal de primatas não humanos da espécie *Macaca fascicularis* de cativeiro. **RESBCAL**, São Paulo, v.4 n.2, pg. 147-148, 2016.

CYSNE, L. B. **Análise comparativa do perfil clínico, hematológico e microbiota intestinal associados com quadros diarréicos e não diarréicos de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) cativos**. 2007. 1v. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2007.

DASSANAYAKE, R. P. ;ZHOU, Y.; HINKLEY, S.; STRYKER, C.J.; PLAUCHE, G.; BORDA, J.T.; SESTAK, K.; DUHAMEL, G.E.Characterization of Cytolethal Distending Toxin of *Campylobacter* Species Isolated from Captive Macaque Monkeys. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 641–649, 1 fev. 2005.

DEDISTE, A.; VANDENBERG, O.; VLAES, L.; EBRAERT, A.; DOUAT, N.; BAHWERE, P.; BUTZLER, J.P. Evaluation of the ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. **Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the european society of clinical microbiology and infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1085–1090, nov. 2003.

DIRAVIYAM, T ;ZHAO, B.; WANG, Y.; SCHADE, R.; MICHAEL, A. ZHANG, X. Effect of Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against Diarrhea in Domesticated Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97716, 20 maio 2014.

ELSEMORE, D.A.; GENG, J.; COTE, J.; HANNA, R.; LUCIO-FORSTER, A.; BOWMAN, D.D. Enzyme-linked immunosorbent assays for coproantigen detection of *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis* in dogs and *Toxocara cati* in cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 5, p. 645–653, set. 2017.

ESTEVEES, W. T. C.; FERREIRA, A. P.; SICILIANO, S. Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter* spp. Estudo de caso: curso inferior do rio São João, RJ, Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 19, p. 74–81, 2011.

FELASA, W. G. On non-human primate health. Health monitoring of non-human primate colonies. Recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on non-human primate health accepted by the FELASA Board of Management, 21 November 1998. **Laboratory Animals**, v. 33 Suppl 1, p. S1-18, 1999

FERREIRA, D. R. A.; SANTOS, A. S.; WAGNER, P. G. C.; REIS, E. M. F.; JÚNIOR, J. W. P.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L.B. G., MOTA, R. A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em *Cebus* spp. mantidos em Centros de Triagem de Animais Silvestres no Nordeste do Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 2, p. 181-186, 2012.

FERNANDO, U.; BISWAS, D.; ALLAN, B.; ATTAH-POKU, S.; WILLSON, P.; VALDIVIESO-GARCIA, A. ; POTTER, A.A. Serological assessment of synthetic peptides of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 FlaA protein using antibodies against multiple serotypes. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 197, n. 1, p. 45–53, mar. 2008.

FLECKNELL, P. Replacement, Reduction and Refinement. **ALTEX**, v. 19, n. 2, p. 73–78, 2002.

FOX, J. G. Campylobacteriosis - a “new” disease in laboratory animals. **Laboratory Animal Science**, v. 32, n. 6, p. 625–637, dez. 1982.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4th ed ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GHOSH, R.; Uppal, B; Aggarwal, P; Chakravarti, A; Jha, A.K.; Dubey A.P. **A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of *Campylobacter* gastroenteritis in children**. Ann Clin Lab Sci. v. 44, n.1 p.42-48. 2014.

GOMES, C. M. B.; BATISTA, K. S.; OLIVEIRA, S. A.; BEZERRA, L. M. Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 11, n. 2, p. 74-80, 2011.

GONÇALVES, M.A.B; SILVA, S.L.S., TAVARES, M.C.H; GROSMANN, N.V.; CIPRESTE C.F.; CASTRO PHG. Comportamento e bem estar animal. In: Andrade A, Andrade MCR, Marinho AM, Ferreira Filho J. **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2010.p.136-60.

GUENTZEL, M.N. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* and *Proteus*. IN: Baron S, editor. **Medical Microbiology**. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 26. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/>> Acesso em: 15 nov. 2017.

HEGEMANN, A.; PARDAL, S.; MATSON, K. D. Indices of immune function used by ecologists are mostly unaffected by repeated freeze-thaw cycles and methodological deviations. **Frontiers in Zoology**, v. 14, p. 43, 2017.

HERMANS, D.; VAN STEENDAM, K.; VERBRUGGHE, E.; VERLINDEN, M.; MARTEL, A.; SELIWIORSTOW, T.; HEYNDRICKX, M.; HAESEBROUCK, F.; DE ZUTTER, L.; DEFORCE, D.; PASMANS, F. Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p.

27, 2014.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE-008: revisão 06 de Nov. 2017 Brasília (DF): INMETRO, 2017, 30p.

KALASHNIKOVA, VA, DZHIKIDZE EK, STASILEVICH ZK, KRYLOVA RI, KEBU TI. Detection of *Campylobacter* in the etiology of acute intestinal infection in primates. **Vestn Ross Akad Med Nauk**. v. (1):6-10, 2006.

KLIMENTZOU, P.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; ZIKOS, C.; BECK, A.; SKOPELITI, M.; CZARNECKI, J.; TSITSILONIS, O.; VOELTER, W.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G.P. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 183–193, jan. 2006.

KRIEF, A.; LETESSON, J.-J.; BILLEN, D. Comparison between “IgY technology” from chickens and “IgG technology” from mice for production of tailor-made antibodies. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 1843–1846, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680, 15 ago. 1970.

LARSSON, A. LARSSON, A.; BÅLÖW, R.M.; LINDAHL, T.L.; FORSBERG, P.O. Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1807–1812, out. 1993.

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. **Circulação de espécies termofílicas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro, Rio de Janeiro. 2000. 125f.** Tese (Doutorado)—Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2000

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L.; HOFER, E. Diversity of *Campylobacter* isolates from three activated sludge systems. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 295–298, jun. 1998.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 130, n. 6, p. 1337–1352, 1 dez. 1969.

LOPES, C. A. A. ; CYSNE, L.B.; ANDRADE, MCR; LISBOA O.A. Agentes infecciosos. In: Andrade A, Andrade MCR, Marinho AM, Ferreira Filho J. **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2010.p.207-57.

MCCLURE H.M. et al. Bacterial Infection of Nonhuman primates. Cap 43 In: **Primates: the road to self-sustaining populations**. Kurt Benirschke Eds. Springer-Verlag. p. 531-556. 1986.

MEDEIROS, V. DE M.; BRICIO, S. M. L.; CLEMENTINO, M. B. M. Identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas de carcaças resfriadas de Frango pela Multiplex PCR. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.0, n.0, 27 nov. 2014.

MINE, Y. (ed.). **Egg bioscience and biotechnology**. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2008.

NOGUEIRA, J.M.R.; SOUZA-MIGUEL, L.F. Bacteriologia. 2010. In: **Conceitos e métodos para formação de profissionais de Laboratório de Saúde**. Ed. Fiocruz. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap3.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

ON, S. L. W. et al. Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* biovar paraureolyticus, a urease-producing variant from cattle and humans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 1, p. 195–206, 1 jan. 1998.

OYARZABAL, O. A.; BATTIE, C. Immunological Methods for the Detection of *Campylobacter* spp. - Current Applications and Potential Use in Biosensors. In: ABUELZEIN E. Immunolabelled and Related Techniques. InTech, 2012. **Trends in Immunolabelled and Related Techniques**. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/trends-in-immunolabelled-and-related-techniques/immunological-methods-for-the-rapid-detection-of-campylobacter-spp-current-applications-and-potent> (Acesso em 24 Jul. 2016)

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43 Spec No, p. 93–100, fev. 2005.

PAUL-MURPHY, J. Bacterial enterocolitis in nonhuman primates. **Zoo and Wild Animal Medicine: current therapy**. v. 3, n. 2º, p. 344–351, 1993.

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. **Poultry Science**, v. 88, n. 2, p. 281–290, 2009.

PIELSTICKER, C.; GLÜNDER, G.; RAUTENSCHLEIN, S. Colonization properties of *Campylobacter jejuni* in chickens. **European Journal of Microbiology & Immunology**, v. 2, n. 1, p. 61–65, mar. 2012.

POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; FAZAKERLEY, G. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. **Immunological Communications**, v. 9, n. 5, p. 495–514, 1980.

POLSON, A.; COETZER, T.; KRUGE, R. J.; VON MALTZAHN, E.; VAN DER MERWE, K.J. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. **Immunological Investigations**, v. 14, n. 4, p. 323–327, ago. 1985.

POLSON, A. Chicken IgY-Fc antibody elicited in a rabbit as first coat on frosted glass beads in immunoassays. **Immunological Investigations**, v. 22, n. 5, p. 353–363, jul. 1993.

PRESGRAVES, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: **ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Orgs.) Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002. p. 361-367. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/12296/2/Animais_Octavio_2.pdf

RADOMSKA, K.A.; VAEZIRAD, M.M.; VERSTAPPEN, K.M.; WÖSTEN, M.M.; WAGENAAR, J.A.; VAN PUTTEN, J.P. Chicken Immune Response after In Ovo Immunization with Chimeric TLR5 Activating Flagellin of *Campylobacter jejuni*. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164837, 2016.

ROLLINS DM, COLWELL RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**. 52(3):531-538,1986.

RUSSELL, R. G.; BLASER, M.J.; SARMIENTO, J.I.; FOX J. Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in *Macaca nemestrina*. **Infection and Immunity**, v.57, n. 5, p. 1438–1444, maio 1989.

RUSSELL, W. M., BURCH, R. L. Chapter 5: Replacement. In: **The principle of humane experimental technique**. Londres: London, Methuem, 1959.

SAILS, A. D., BOLTON, F. J., FOX, A. J., WAREING, D. R. A., & GREENWAY, D. L. A. “Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environmental Waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.” **Applied and Environmental Microbiology** v.68, n.3 p.1319–1324 (2002).

SANTOS, F. N. **Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2012. xvi, 98 f. Tese (Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012.

SAISSE, A.O; BORGES, C.C.A; LOPES, C.A.A; CYSNE L.B.; FRISSE, M.A.A.; LISBOA, A.O. et al. Controle sanitário. In: ANDRADE A, ANDRADE MCR, MARINHO AM, FERREIRA FILHO J. *Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010. p.259-313.

SASSEVILLE, V. G.; DITERS, R. W. Impact of infections and normal flora in nonhuman primates on drug development. **ILAR journal**, v. 49, n. 2, p. 179–190, 2008.

SCHADE, R. STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH,

G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; VAN REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The Production of avian (Egg yolk) antibodies: IgY - The report and recommendation of ECVAN workshop 21. **Alternatives to Laboratory Animals**: ATLA, v. 24, p. 925–934, 1996.

SCHADE, R. CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J., TERZOLO, H.R; Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**: ATLA, v. 33, n. 2, p. 129–154, abr. 2005.

SESTAK, K. MERRITT, C.K.; BORDA, J.; SAYLOR, E.; SCHWAMBERGER, S.R.; COGSWELL, F.; DIDIER, E.S.; DIDIER, P.J.; PLAUCHE, G.; BOHM, R.P.; AYE, P.P.; ALEXA, P.; WARD, R.L.; LACKNER, A.A. **Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques**. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4079–4086, jul. 2003.

SMYTH, D. H. **Alternatives to animal experiments**. London: Scolar Press [for] the Research Defence Society, 1978.

TATE J, WARD G. Interferences in Immunoassay. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 25(2):105-120, maio 2004.

TAYLOR, K. (EURL-ECVAM) EU Member State Government Contribution to Alternative Methods. **ALTEX**, 24 jan. 2014.

TOLJANDER, J. et al. Public health burden due to infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Campylobacter* spp. as estimated by cost of illness and different approaches to model disability-adjusted life years. **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 40, n. 3, p. 294–302, maio 2012.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, set. 1979.

THOLOZAN, J. L; CAPPELIER, J.M.; TISSIER, J.P.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1110–1116, mar. 1999.

THU, H. M.; MYAT, T.W.; WIN, M.M.; THANT, K.Z.; RAHMAN, S.; UMEDA, K.; NGUYEN, S.V.; ICATLO, F.C. JR.; HIGO-MORIGUCHI, K.; TANIGUCHI, K.; TSUJ, I T.; OGUMA, K.; KIM, S.J.; BAE, H.S.; CHOI, H.J. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) for Prophylaxis and Treatment of Rotavirus Diarrhea in Human and Animal Neonates: A Concise Review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 1, p. 1–9, 2017.

TRABULSI, L. R.; CARVALHO, L. Cap.27 Generalidade sobre Enterobactérias. In-TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.207

UEKI, Y. FUJIMOTO, S.; UMEDA, A.; AMAKO, K. Purification and antigenic analysis of flagella of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and immunology**, v. 32, n. 4, p. 327–337, 1988.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E.; CLARK M. F. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33: 165-67, doi: 10.1099/0022-1317-33-1-165; 1976.

VERON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Veron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 2, p. 122–134, 1 abr. 1973.

VILARDO, M. DE C. B.; THOMÉ, J. D. S; ESTEVES, W. T. C.; LAURIA FILGUEIRAS, A. L.; OLIVEIRA, S. S. Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 499–501, ago. 2006

WASSENAAR, T. M. Toxin Production by *Campylobacter* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 466–476, jul. 1997.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Campylobacter**, outubro 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

ZORRIEHZAH, M. J.; TIWARI, R.; SACHAN, S.; KARTHIK, K.; MALIK, Y. S.; DADAR, M.; SARWAR, M.; SAYAB, M.; DHAMA, K. Avian Egg Yolk Antibodies (IgY) and their Potential Therapeutic Applications for Countering Infectious Diseases of Fish and Aquatic Animals. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 8, p. 760–768, 15 out. 2016.

ANEXOS

Anexo 1- Bula do fabricante do meio de cultura utilizado para *Campylobacter*.

Columbia Agars

Columbia Agar Base • Columbia Blood Agar Base Columbia Blood Agar Base EH • Columbia Agar with 5% Sheep Blood • Columbia Agar with Fildes Enrichment and Bacitracin

Intended Use

Columbia Agar Base, without or with the addition of 5% (or 10%) sheep blood, is a highly nutritious, general-purpose medium for the isolation and cultivation of nonfastidious and fastidious microorganisms from a variety of clinical and nonclinical materials.

Columbia Blood Agar Base EH (Enhanced Hemolysis) is used with blood in isolating and cultivating fastidious microorganisms.

Columbia Agar with Fildes Enrichment and Bacitracin is used in qualitative procedures for isolation and cultivation of *Haemophilus* species from clinical specimens.

Summary and Explanation

Ellner et al.,¹ in 1966, reported the development of a blood agar formulation, which has been designated as Columbia Agar. The base achieves the more rapid and luxuriant growth obtained from casein hydrolysate media with the sharply defined hemolytic reactions, more typical colonial morphology and improved pigment production achieved with media containing infusion peptone.

The Columbia Agar Base is utilized as the base for media containing blood and for selective media formulations in which various combinations of antimicrobial agents are used as additives.

Sheep blood allows detection of hemolytic reactions and supplies the X factor (heme) necessary for the growth of many bacterial species but lacks V factor (nicotinamide adenine dinucleotide), since it contains NADase which destroys the NAD. For this reason, *Haemophilus influenzae*, which requires both the X and V factors, will not grow on this medium. Fildes found that

supplementing nutrient agar with a digest of sheep blood supplied both of these factors and the medium would support the growth of *H. influenzae*.^{2,3} The inclusion of bacitracin makes the enriched Columbia Agar medium selective for the isolation of *Haemophilus* species from clinical specimens, especially from the upper respiratory tract.⁴

Principles of the Procedure

Columbia Agar Base supplemented with sheep, rabbit or horse blood derives its superior growth-supporting properties from the combination of peptones prepared from pancreatic digest of casein, peptic digest of animal tissue and beef extract. Yeast extract and corn starch are also included in the formulation and serve as energy sources with yeast extract being a supplier of the B-complex vitamins.

It should be noted that Columbia Sheep Blood Agar has a relatively high carbohydrate content and, therefore, beta-hemolytic streptococci may produce a greenish hemolytic reaction that may be mistaken for alpha hemolysis.

Fildes enrichment is prepared by the action of the enzyme pepsin on defibrinated sheep blood. Bacitracin is a polypeptide antibiotic that is active mainly against gram-positive bacteria.

Formulae

Difco™ Columbia Blood Agar Base

Approximate Formula* Per Liter	
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g
Proteose Peptone No. 3	5.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Beef Heart Digest	3.0 g
Corn Starch	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g

User Quality Control

NOTE: Differences in the Identity Specifications and Cultural Response testing for media offered as both Difco™ and BBL™ brands may reflect differences in the development and testing of media for industrial and clinical applications, per the referenced publications.

Identity Specifications

Difco™ Columbia Blood Agar Base

Dehydrated Appearance:	Beige, free-flowing, homogeneous.
Solution:	4.4% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light to medium amber, opalescent with fine precipitate.
Prepared Appearance:	Plain – Light to medium amber, slightly opalescent to opalescent with fine precipitate. With sheep blood – Cherry red, opaque, no hemolysis.
Reaction of 4.4% Solution at 25°C:	pH 7.3 ± 0.2

Difco™ Columbia Blood Agar Base EH

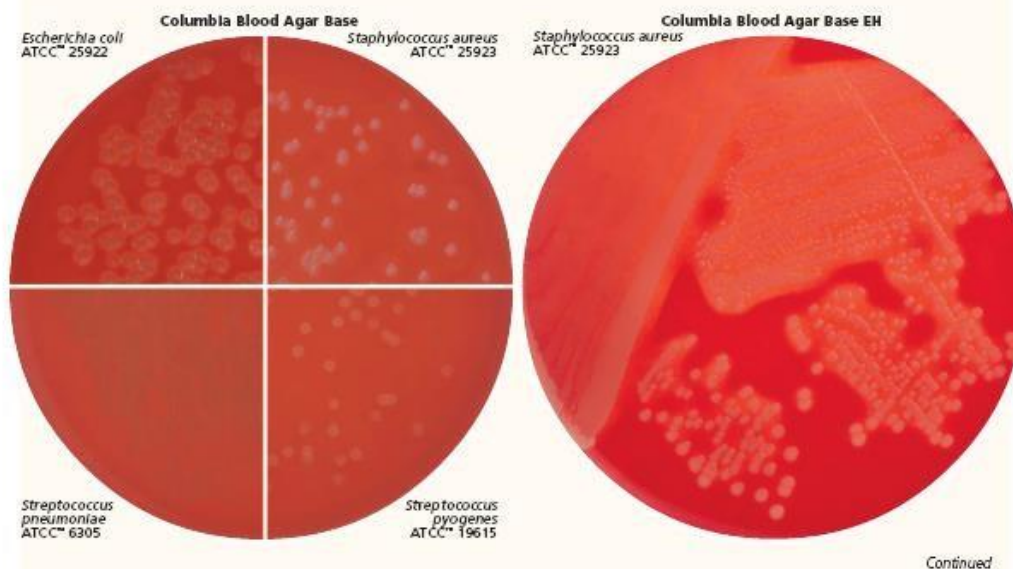
Dehydrated Appearance:	Beige, free-flowing, homogeneous.
Solution:	3.9% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light to medium amber, clear to slightly opalescent.
Prepared Appearance:	Plain – Light to medium amber, clear to slightly opalescent. With sheep blood – Medium to bright cherry red, opaque, no hemolysis.
Reaction of 3.9% Solution at 25°C:	pH 7.3 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Columbia Blood Agar Base or Columbia Blood Agar Base EH

Prepare the medium per label directions without (plain) and with 5% sheep blood (SB) for Columbia Blood Agar Base and with 5% sheep blood for Columbia Blood Agar Base EH. Inoculate and incubate at 35 ± 2°C with 5-10% CO₂ for 18-48 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY PLAIN	RECOVERY WITH SB	HEMOLYSIS
<i>Escherichia coli</i>	25922	30-300	Good	Good	Beta
<i>Neisseria meningitidis</i>	13090	30-300	Good	Good	Gamma (none)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	30-300	Good	Good	Beta
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	30-300	Good	Good	Alpha
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	30-300	Good	Good	Beta



Continued

The base achieves the more rapid and luxuriant growth obtained from casein hydrolysate media with the sharply defined hemolytic reactions, more typical colonial morphology and improved pigment production achieved with media containing infusion peptone.

The Columbia Agar Base is utilized as the base for media containing blood and for selective media formulations in which various combinations of antimicrobial agents are used as additives.

Sheep blood allows detection of hemolytic reactions and supplies the X factor (heme) necessary for the growth of many bacterial species but lacks V factor (nicotinamide adenine dinucleotide), since it contains NADase which destroys the NAD. For this reason, *Haemophilus influenzae*, which requires both the X and V factors, will not grow on this medium. Fildes found that

tively high carbohydrate content and, therefore, beta-hemolytic streptococci may produce a greenish hemolytic reaction that may be mistaken for alpha hemolysis.

Fildes enrichment is prepared by the action of the enzyme pepsin on defibrinated sheep blood. Bacitracin is a polypeptide antibiotic that is active mainly against gram-positive bacteria.

Formulae

Difco™ Columbia Blood Agar Base

Approximate Formula* Per Liter	
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g
Proteose Peptone No. 3	5.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Beef Heart Digest	3.0 g
Corn Starch	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g

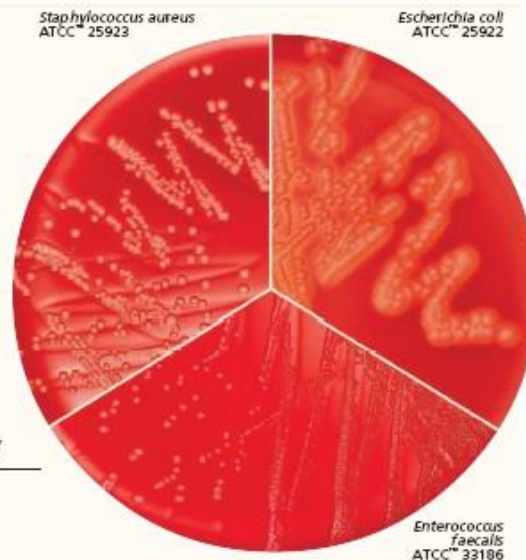
Identity Specifications**BBL™ Columbia Agar Base**

Dehydrated Appearance:	Fine, homogeneous, free of extraneous material.
Solution:	4.25% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is medium, yellow to tan, hazy.
Prepared Appearance:	Plain – Medium, yellow to tan, hazy. With sheep blood – Cherry red, opaque, no hemolysis.
Reaction of 4.25% Solution at 25°C:	pH 7.3 ± 0.2

Cultural Response**BBL™ Columbia Agar Base**

Prepare the medium per label directions without (plain) and with 5% sheep blood (SB). Inoculate and incubate at 35 ± 2°C under appropriate atmospheric conditions for 48 hours (incubate *C. jejuni* at 42 ± 2°C for 48-72 hours).

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY PLAIN	RECOVERY WITH SB
<i>Campylobacter jejuni</i>	33291	10 ²	N/A	Good
<i>Campylobacter jejuni</i>	33292	10 ²	N/A	Good
<i>Candida albicans</i>	10231	10 ² -10 ⁶	N/A	Good
<i>Escherichia coli</i>	25922	10 ¹ -10 ⁶	N/A	Good
<i>Listeria monocytogenes</i>	19115	10 ¹ -10 ⁶	N/A	Good
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	10 ¹ -10 ⁶	Good	N/A
<i>Shigella flexneri</i>	12022	10 ¹ -10 ⁶	Good	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10 ¹ -10 ⁶	Good	Good, beta hemolysis
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	10 ¹ -10 ⁶	Good	Good, alpha hemolysis
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	10 ¹ -10 ⁶	N/A	Good, beta hemolysis

**BBL™ Columbia Agar Base**

Approximate Formula* Per Liter	
Pancreatic Digest of Casein	12.0 g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Beef Extract	3.0 g
Corn Starch	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	13.5 g

Difco™ Columbia Blood Agar Base EH

Approximate Formula* Per Liter	
Pantone	12.0 g
Bitone H Plus	6.0 g
Enzymatic Digest of Animal Tissue	3.0 g
Starch	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	12.0 g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

- Suspend the powder in 1 L of purified water:
Difco™ Columbia Blood Agar Base – 44 g;
BBL™ Columbia Agar Base – 42.5 g;
Difco™ Columbia Blood Agar Base EH – 39 g.
Mix thoroughly.
- Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.

- Autoclave at 121°C for 15 minutes.

- For preparation of blood agar, cool the base to 45-50°C and add 5% sterile, defibrinated blood. Mix well.

- Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure


Use standard procedures to obtain isolated colonies from specimens. Incubate plates at 35 ± 2°C for 18-72 hours.

Since many pathogens require carbon dioxide on primary isolation, plates may be incubated in an atmosphere containing approximately 3-10% CO₂.

Expected Results

After incubation most plates will show an area of confluent growth. Because the streaking procedure is, in effect, a "dilution" technique, diminishing numbers of microorganisms are deposited on the streaked areas. Consequently, one or more of these areas should exhibit isolated colonies of the organisms contained in the specimen. Further, growth of each organism may be semiquantitatively scored on the basis of growth in each of the streaked areas.

Anexo 2 – certificado de treinamento para manipulação do *Campylobacter* sp.

	<p>Ministério da Saúde FIQCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz Laboratório de Zoonoses Bacterianas Coleção de <i>Campylobacter</i></p>	<p>Coleção de Campylobacter Laboratório de Zoonoses Bacterianas CCAMP - IOC - FIOCRUZ/RJ</p>
DECLARAÇÃO		
<p>Esta declaração é conferida à PAULA BORBA CRUZ pela participação no <i>Treinamento em Técnicas de Cultivo, Identificação e Manutenção de Linhagens de Campylobacter spp.</i>, realizado na Coleção de <i>Campylobacter</i> no período de 22 a 26 de fevereiro de 2016, com carga horária total de 40 horas.</p>		
Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2016.		
<p>Sheila Duque Curadora CCAMP IOC / FIOCRUZ Mat. SIAPE 1630262</p>		
_____ Curador da Coleção de <i>Campylobacter</i>		
1/1		
<p>Coleção de <i>Campylobacter</i> - Av. Brasil, 4366, Caixa Postal 828 - CEP 21040-900 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil - Pavilhão Rocha Lima, sala 516 Telefone: + 55 21 2562-1632 / Fax: + 55 21 2562-1634 ccamp@fiocruz.br</p>		

Anexo 3 -Eletroforese SDSPAGE

Preparo das amostras

As amostras serão diluídas 1:4 em tampão de amostras 4X e submetidas à fervura por 3 minutos em micro-ondas e submetida a choque térmico em banho de gelo.

Gel de poliacrilamida

Reunir em um frasco limpo os componentes da tabela abaixo tomando o cuidado deixar por último a TEMED e o APS 10% homogeneizar antes de aplicar entre as placas de vidro no suporte do mini-protean III Bio-Rad©. Fechar o contato com a atmosfera aplicando 200µL de 2-butanol, o que vai acelerar a polimerização. Após verificar se o gel esta polimerizado retira o 2-butanol com auxílio de papel de filtro. Prepara o gel de empilhamento em um tubo limpo e aplica sob o gel de corrida e coloca o pente para a formação dos poços onde as amostras diluídas 1:4 com tampão de amostra 4x.

Reagente	Gel de corrida 12%	Gel de empilhamento 4%
Água destilada	3,29 mL	3,0mL
Solução tris Hcl ph6.8	-	1,25mL
Solução tris Hcl ph8.8	2,5mL	-
Solução poliacrilamida 30%	4mL	650 µL
Solução10% de dodecil-sulfato de sódio(SDS)	100 µL	100 µL
Solução persulfato de amônio 10%	100 µL	50 µL
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 µL	10 µL

Corrida eletroforética

Acopla as placas com gel no suporte de corrida, as amostras são aplicadas nos orifícios correspondentes (20 µL) e o gel submetido a corrente a 200V por cerca de 50 minutos até o início da saída do corante do tampão da amostra.

Anexo 4 -Protocolo para revelação de bandas em gel de Poliacrilamida (LATER - BIOMANGUINHO FIOCRUZ)

Soluções

Solução de Fixação (Solução A)

- Metanol - 50%
- Ácido Acético - 10%

*Para 1litro – 500mL metanol + 100mL de Ácido Acético + 400mL de água MilliQ

Solução de coloração rápida (Solução B)

- Etanol - 5%
- Ácido acético - 7,5%

*Para 1L – 50mL de etanol + 75mL de Ácido Acético + 875mL de água MilliQ

Solução de azul brilhante (Comassie Blue – 0,25%);

*Para 100mL – 0,25g de corante + 100mL de etanol 95%.

Solução descorante

- Metanol - 5%
- Ácido Acético - 7%

*Para 1L – 50mL de metanol + 70mL Ácido Acético + 880mL de água MilliQ;

**Soluções validas por 3 meses.

Procedimento de coloração rápida: Comassie Blue R250 e G250

No gel em um recipiente plano;

1. Adicionar aproximadamente 50mL (volume que cubra o gel) de Solução A;
2. Aquecer 30 segundos em micro-ondas ou 3 minutos em placa aquecedora (~90°C);
3. Agitar 20 minutos;
4. Trocar a solução e repetir os passos 2 e 3 (2 vezes);
5. Descartar a solução de fixação;
6. Adicionar aproximadamente 50mL e Solução B + 1mL de solução de Azul Brilhante (Comassie blue 0,25%);
7. Aquecer 60 segundos em microondas ou 6 minutos em placa aquecedora;
8. Agitar 20 minutos;
9. Repetir o aquecimento até as bandas aparecerem;
10. Descartar a Solução B;
11. Adicionar solução descorante (volume suficiente para cobrir o gel);

Anexo 5 - Licença CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-16/17

Certificamos que o protocolo (P-35/16-2), intitulado "Desenvolvimento de kit Imunoenzimático para detecção de *Campylobacter* spp. em fezes de primatas não humanos utilizando IgY como imunorreagente.", 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 exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 05/06/2021 e inclui o uso total de :

Gallus gallus domesticus

- 4 Fêmeas, Idade: 20 Semana(s), Peso: 1,8000 Kilo(s).

Rio de Janeiro, 5 de junho d

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096
05/06/2017

Anexo 6-Protocolo Hi-trap fabricante

Instructions 71-5004-38 AL

HiTrap™ IgY Purification HP, 5 ml

HiTrap IgY Purification HP is a prepacked, ready to use, column for purification of IgY from egg yolk. The special design of the column, together with the matrix, provides fast, simple and easy separations in a convenient format. The column can be operated with a liquid chromatography system such as ÄKTA™. It can also be used with a peristaltic pump or a simple syringe.



Table of contents

1. Product description	3
2. Operation	5
3. Scaling up	7
4. Adjusting pressure limits in chromatography system software ..	8
5. Storage.....	9
6. Ordering Information.....	10

Please read these instructions carefully before using HiTrap columns.

Intended use

HiTrap columns are intended for research use only, and shall not be used in any clinical or *in vitro* procedures for diagnostic purposes.

Safety

For use and handling of the product in a safe way, please refer to the Safety Data Sheet.

1 Product description

HiTrap column characteristics

The columns are made of biocompatible polypropylene that does not interact with biomolecules.

The columns are delivered with a stopper at the inlet and a snap-off end at the outlet. Table 1 lists the characteristics of HiTrap columns.



Fig 1. HiTrap, 5 ml column.

Note: *HiTrap columns cannot be opened or refilled.*

Note: *Make sure that the connector is tight to prevent leakage.*

Table 1. Characteristics of HiTrap columns.

Column volume (CV)	5 ml
Column dimensions	1.6 x 2.5 cm
Column hardware pressure limit	5 bar (0.5 MPa)

Note: *The pressure over the packed bed varies depending on a range of parameters such as the characteristics of the chromatography medium, sample/liquid viscosity and the column tubing used.*

Supplied Connector kit with HiTrap column

Connectors supplied	Usage	No. supplied
Union 1/16" male/luer female	For connection of syringe to HiTrap column	1
Stop plug female, 1/16"	For sealing bottom of HiTrap column	2, 5 or 7

Medium properties

HiTrap IgY Purification HP is a thiophilic adsorption medium with 2-mercaptopyridine coupled to Sepharose™ High Performance.

Thiophilic adsorption was first described by Porath et al. (*FEBS Lett.*, 1985, 185, 306–310) and is promoted by water-structuring salts. The interaction between protein and ligand has been suggested to result from a combined electron donating and accepting action of the ligand, or alternatively, as a mixed mode hydrophilichydrophobic interaction.

The base-matrix is a rigid, highly cross-linked, beaded agarose with high chemical stability.

The main application area for HiTrap IgY Purification HP is purification of IgY from chicken egg yolk, but it can also be used for purification of other immunoglobulins.

Table 2. HiTrap IgY Purification HP characteristics

Ligand	2-mercaptopyridine
Ligand concentration	3 mg/ml
Binding capacity ¹	100 mg pure IgY per 5 ml column 1/4 egg yolk per 5 ml column
Mean particle size	34 µm
Bead structure	Highly cross-linked spherical agarose
Maximum flow rate	20 ml/min
Recommended flow rate	5 ml/min
pH stability ²	
Working range	3 to 11
Cleaning-in-place	2 to 13
Storage	4°C to 30°C in 20% ethanol

¹ Running conditions according to the recommendations found in Section 2. Operation.

² Working range pH: pH interval where the medium can be operated without significant change in function.

Cleaning-in-place pH: pH stability where the medium can be subjected to cleaning- or sanitization-in-place without significant change in function.

2 Operation

Buffer preparation

Water and chemicals used for buffer preparation should be of high purity. It is recommended to filter the buffers by passing them through a 0.45 µm filter before use.

Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M K₂SO₄, pH 7.5.

Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.5.

Cleaning buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.5 with 30% isopropanol

Sample preparation

As many of the egg yolk lipids as possible must be removed before purification. These can be precipitated using different methods, for example with water or PEG. Precipitation with water is described below.

Separate the egg yolk from the egg white. To one part egg yolk add nine parts of distilled water. Mix and stir slowly for 6 hours at 4°C. Centrifuge at 10 000 × g, at 4°C for 25 minutes to precipitate the lipids. Collect the supernatant containing the IgY.

While stirring slowly, add K₂SO₄ to the sample to a final concentration of 0.5 M. Adjust the pH to 7.5. Pass the sample through a 0.45 µm filter immediately before applying to the HiTrap IgY Purification HP column.

Purification

The purification capacity for HiTrap IgY Purification HP is approximately 1/4 of an egg yolk per 5 ml column. This capacity can be increased by connecting two or more columns in series (back pressure will increase). The recommended flow rate for HiTrap IgY Purification HP is 5 ml/min.

- 1 Remove the stopper.
- 2 Fill the syringe or pump tubing with binding buffer. Using the connector provided, connect the column "drop to drop" to the syringe, or pump tubing, to avoid introducing air into the column.
- 3 Remove the snap-off end at the column outlet.
- 4 Wash the column with at least 5 column volumes (CV) of each buffer: Binding, elution and cleaning buffers.
- 5 Equilibrate the column with 5 CV of binding buffer.
- 6 Apply the sample, using a syringe fitted to the luer adapter or by pumping it onto the column.
- 7 Wash with at least 10 CV of binding buffer or until no material appears in the effluent.

- 8 Elute the IgY with 10 CV of elution buffer.
- 9 Regenerate the column with 8 CV of cleaning buffer.
- 10 Re-equilibrate the column with 5 CV of binding buffer.

Note: *The reuse of HiTrap IgY Purification HP depends on the nature of the sample. To prevent cross-contamination, it should only be reused with identical samples.*

Note: *If a P1-pump is used a max flow rate of 1-3 ml/min can be run on a HiTrap 1 ml column packed with Sepharose High Performance media.*

Binding

To improve recovery of total IgY or a specific IgY antibody the 0.5 M K_2SO_4 in the binding buffer can be replaced with 0.6 to 0.8 M Na_2SO_4 . The sample should have the same concentration of Na_2SO_4 as the binding buffer. An increase in salt concentration will, however, adversely affect the purity of the eluted IgY.

Elution

The purity of the eluted IgY may be improved by using gradient elution with, for example, a linear gradient 0–100% elution buffer over 10 column volumes, followed by elution at 100% elution buffer for a few column volumes. Gradients can be achieved by use of a liquid chromatography system such as ÄKTA system.

3 Scaling up

For quick scale-up of purification, two or three HiTrap columns can be connected in series (back pressure will increase).

4 Adjusting pressure limits in chromatography system software

Pressure generated by the flow through a column affects the packed bed and the column hardware, see Fig 2. Increased pressure is generated when running/using one or a combination of the following conditions:

- High flow rates
- Buffers or sample with high viscosity
- Low temperature
- A flow restrictor

Note: Exceeding the flow limit (see Table 2) may damage the column.

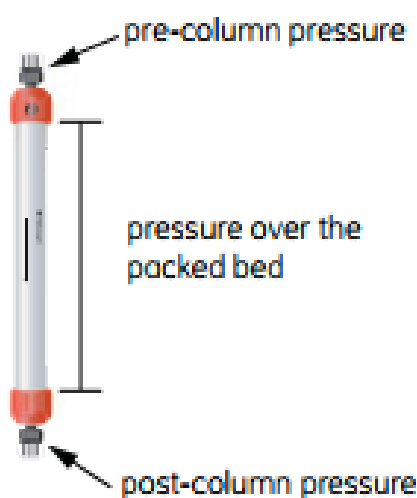


Fig 2. Pre-column and post-column measurements.

ÄKTA avant and ÄKTA pure

The system will automatically monitor the pressures (pre-column pressure and pressure over the packed bed, Δp). The pre-column pressure limit is the column hardware pressure limit (see Table 1).

The maximum pressure the packed bed can withstand depends on media characteristics and sample/liquid viscosity. The measured value also depends on the tubing used to connect the column to the instrument.

ÄKTAexplorer, ÄKTApurifier, ÄKTAFFPLC and other systems with pressure sensor in the pump

To obtain optimal functionality, the pressure limit in the software may be adjusted according to the following procedure:

- 1 Replace the column with a piece of tubing. Run the pump at the maximum intended flow rate. Note the pressure as *total system pressure*, P1.
- 2 Disconnect the tubing and run the pump at the same flow rate used in step 1. Note that there will be a drip from the column valve. Note this pressure as P2.
- 3 Calculate the new pressure limit as a sum of P2 and the column hardware pressure limit (see Table 1). Replace the pressure limit in the software with the calculated value.

The actual pressure over the packed bed (Δp) will during run be equal to actual measured pressure - *total system pressure* (P1).

Note: *Repeat the procedure each time the parameters are changed.*

5 Storage

Store the column at 4°C to 30°C in 20% ethanol.

6 Ordering Information

Product	Quantity	Code No.
HiTrap IgY Purification HP	1 × 5 ml	17-5111-01

Related products	Quantity	Code No.
HiTrap Desalting	1 × 5 ml	29-0486-B4
	5 × 5 ml	17-1408-01
PD-10 Desalting Column	30	17-0851-01

Accessories	Quantity	Code No.
1/16" male/luer female <i>(For connection of syringe to top of HiTrap column)</i>	2	18-1112-51
Tubing connector flangeless/M6 female <i>(For connection of tubing to bottom of HiTrap column)</i>	2	18-1003-68
Tubing connector flangeless/M6 male <i>(For connection of tubing to top of HiTrap column)</i>	2	18-1017-98
Union 1/16" female/M6 male <i>(For connection to original FPLC System through bottom of HiTrap column)</i>	6	18-1112-57
Union M6 female /1/16" male <i>(For connection to original FPLC System through top of HiTrap column)</i>	5	18-3858-01
Union luerlock female/M6 female	2	18-1027-12
HiTrap/HiPrep, 1/16" male connector for ÄKTA design	8	28-4010-81
Stop plug female, 1/16" <i>(For sealing bottom of HiTrap column)</i>	5	11-0004-64
Fingertight stop plug, 1/16"	5	11-0003-55

Literature	Quantity	Code No.
Affinity Chromatography Handbook, Principles and Methods	1	18-1022-29
Affinity Chromatography Columns and Media, Selection Guide	1	18-1121-86
Prepacked chromatography columns for ÄKTA systems, Selection guide	1	28-9317-78

For local office contact information, visit
www.gelifesciences.com/contact

GE Healthcare Bio-Sciences AB
Björkgatan 30
751 84 Uppsala
Sweden

www.gelifesciences.com/hitrap
www.gelifesciences.com/protein-purification

GE Healthcare Europe GmbH
Munzinger Strasse 5,
D-79111 Freiburg,
Germany

GE Healthcare UK Ltd
Amersham Place
Little Chalfont
Buckinghamshire, HP7 9NA
UK

GE Healthcare Bio-Sciences Corp
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327 Piscataway,
NJ 08855-1327
USA

GE Healthcare Japan Corporation
Sanken Bldg.
3-25-1, Hyakunincho
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073
Japan

GE and GE monogram are trademarks of General Electric Company.

ÄKTA, HiTrap, and Sepharose are trademarks of Electric Companies companies or one of its subsidiaries

© 2005-2014 General Electric Company - All rights reserved.
Previously published Mar. 2005.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within GE Healthcare which supplies them. A copy of these terms and conditions is available on request. Contact your local GE Healthcare representative for the most current information.



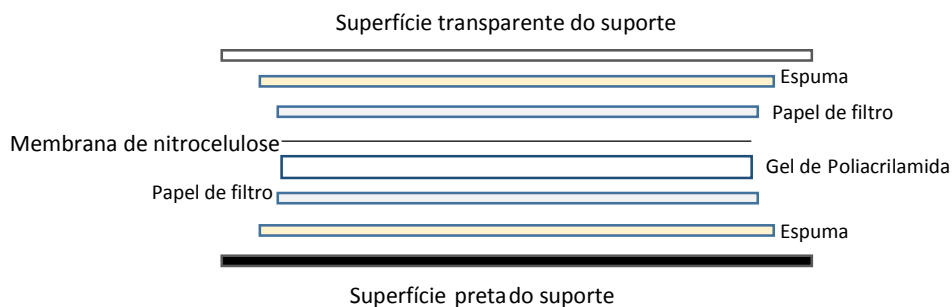
Anexo 7 – Protocolo de transferência e Western blot

Material

- **Tampão de transferência** (usar gelado)
 - 3,03 gramas tris-base
 - 14,4 gramas glicina
 - 20% do volume final (200ml) de metanol
 - Água qsp 1Litro
- **Cuba de transferência e gel no suporte correspondente**
- **Papel de filtro**
- **Membrana de nitrocelulose com poro 0,22 μm**
- **Gel SDSPAGE já submetido a corrida eletroforética sem corar**
- **Forte para eletroforese**

Procedimento

1. A montagem do gel no suporte foi realizada seguindo o seguinte esquema:



2. O suporte foi colocado na cuba com o gelo e todo material imerso em tampão de transferência gelado.
3. Com a tampa a cuba é ligada a fonte eletroforética e o material é submetido a corrente de 200 volts por duas horas
4. Concluído o período a corrente é desligada o gel pode ser descartado e a membrana esta pronta para a reação de Western Blot.

Western blot

A membrana após a transferência, contendo as proteínas foi incubada overnight com PBS-T a 0,05% acrescido de 5% de leite (tampão de bloqueio) a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T a 0,05%. Foi preparada a diluição da IgY 1:250 em tampão de bloqueio. Aplicada a diluição a membrana será incubada por uma hora a 37°C. Finalizada a incubação o líquido é descartado e o processo de lavagem foi repetido. Descarta-se a solução de lavagem. Em seguida, a membrana foi imersa em solução anti-IgY conjugada a peroxidase (Sigma) numa diluição de 1:8000 (TOWBIN et al., 1979) em tampão de bloqueio. O passo seguinte foi a incubação por 1 hora. Finalizada a incubação o líquido é descartado novamente. É preparada a solução de revelação (60ml de tampão citrato marca sigma cat.p4809 lote053k8206, 20 µL de peróxido de hidrogênio 30-32% supra puro marca Vetec cod.18731 lote 0805129 e 0.016g de 3'3'diaminobenzidina tetrahydrochloride hydrate marca sigma cat.5637 lote 76H1102) após alguns minutos será possível visualizar as bandas com coloração marrom referentes a reação imunológica. Descarta-se o líquido e acrescenta água destilada suficiente para cobrir a membrana e parar a reação.