

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Produção e caracterização de IgY contra a proteína recombinante LigBrep de
Leptospira interrogans

Jéssica Waldman

Pelotas, 2015

Jéssica Waldman

**Produção e caracterização de IgY contra a proteína recombinante LigBrep de
*Leptospira interrogans***

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

W164p Waldman, Jéssica

Produção e caracterização de IgY contra a proteína recombinante LigBrep de *Leptospira interrogans* / Jéssica Waldman. – 58f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Éverton Fagonde da Silva.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Diagnóstico.
4.Imunoglobulina Y. 5.*Leptospira interrogans*. I.Silva, Éverton Fagonde da. II.Título.

Jéssica Waldman

Produção e caracterização de IgY contra a proteína recombinante LigBrep de
Leptospira interrogans

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção de grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 02 de dezembro de 2015

Banca examinadora:

Professor Doutor Éverton Fagonde da Silva (Orientador Acadêmico), Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2008)

Doutor Amilton Clair Pinto Seixas Neto, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2014)

Professor Doutor Geferson Fischer, Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2007)

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosane e Me. Ricardo que me proporcionaram a realização deste sonho, sem eles não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rosane e Me. Ricardo, que me deram todo o apoio e me proporcionaram a realização deste sonho. A minha mãe, agradeço pela dedicação a mim desde os primeiros dias de vida, pela paciência, carinho, pelos ensinamentos e por pensar em mim antes de si própria. Ao meu pai, agradeço por oportunizar a realização deste sonho e por me mostrar que mesmo depois de uma carreira sólida e estabelecida é possível formar-se em outro curso, fazer especialização e mestrado. Essa tua força de vontade me incentiva e me mostra que é possível alcançar os objetivos mesmo diante às adversidades.

À minha avó paterna, Olga Waldman (*in memoriam*), minha fonte de inspiração, minha musa que me ensinou, já na infância, o amor pelo estudo, pela cultura e pela perseverança. A ela, toda a minha honra, admiração, respeito e saudades!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva por participar do início da minha carreira acadêmica acreditando no meu potencial, me possibilitando o estágio de Iniciação Científica desde os primeiros semestres da faculdade e o desenvolvimento do projeto tão esperado e querido por mim, no qual eu acredito e me orgulho muito por fazer parte.

Ao Dr. Amilton Seixas, meu querido amigo e colega de laboratório, a quem devo todo o meu conhecimento. O mestre que teve paciência de me ensinar tudo, durante todos os dias, desde o início da minha carreira acadêmica, a quem devo o meu conhecimento. Serei eternamente grata!

Ao Grupo de Estudos em Doenças Transmitidas por Animais, por terem me acolhido desde o primeiro momento, pela amizade e ensinamentos, a quem recorri em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Odir Dellagostin e ao Laboratório de Vacinologia, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Geferson Fischer por aceitar o meu convite para ser a minha banca no Trabalho de Conclusão de Curso.

À Nathalia Pedra e família pela amizade, auxílio, preocupação e apoio em todos os momentos vividos em Pelotas.

À Fernanda Kegles pela linda e duradoura amizade construída ao longo da faculdade e que levarei para a vida inteira, pelo apoio e ajuda em todos os momentos

e à Nóriis Kegles por toda amizade e acolhimento nas horas boas e difíceis que vivi em Pelotas.

Deixo aqui, o meu muito obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte desta longa jornada!

Resumo

WALDMAN, Jéssica. **Produção e caracterização de IgY contra a proteína recombinante LigBrep de *Leptospira interrogans***. 2015. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A leptospirose é uma doença infecciosa bacteriana de caráter endêmico ocasionada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Os testes diagnósticos para leptospirose existentes apresentam sérias limitações, principalmente para a detecção da doença na fase aguda, dessa forma novas estratégias de métodos diagnósticos têm sido estudadas. A Imunoglobulina Y, apresenta-se como o principal anticorpo produzido por aves, encontrada, principalmente, nas gemas dos ovos das galinhas (*Gallus domesticus*), sendo um método diário e rápido para obtenção de anticorpos. No presente estudo, foi realizada a produção e extração de IgY anti-rLigBrep de *Leptospira interrogans* e foi demonstrada a sua aplicação em testes diagnósticos, utilizando ELISA, para a detecção da *Leptospira* em cultivo de *Leptospira interrogans* de baixa passagem (9:6) isolado de soros de animais experimentalmente contaminados. O limite de detecção encontrado pela IgY anti-rLigBrep para a bactéria foi de 10^1 (10) Leptospiras por ml, o desvio padrão encontrado (0,002828) demonstra que as replicatas estão correlacionadas. Sendo a obtenção da Imunoglobulina Y anti-rLigBrep um método ético, com uma boa quantidade de anticorpos específicos obtidos, reduzindo as manipulações dolorosas dos animais e a partir do limite de detecção encontrado, foi possível demonstrar, com este estudo, que a utilização de IgY anti-rLigBrep em testes diagnósticos para a detecção da leptospirose, apresenta-se como uma alternativa passível de ser utilizada com amostras clínicas, no entanto mais testes são necessários para a comprovação do método.

Palavras-chave: leptospirose; diagnóstico; imunoglobulina Y

Abstract

WALDMAN, Jéssica. **Production and characterization of IgY against the recombinant protein LigBrep of *Leptospira interrogans***. 2015. 58f. Final Paper – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Leptospirosis is a bacterial infectious disease of endemic caused by pathogenic species of genus *Leptospira*. The existing diagnostic tests for leptospirosis have serious limitations, mainly for the detection of disease in the acute phase, thus new strategies for diagnosis methods have been studied. The Immunoglobulin Y, presents itself as the primary antibody produced by birds, found mainly in egg yolks of chickens (*Gallus domesticus*), with a daily and rapid method to obtain antibodies. In this study, the production and extraction of IgY anti-rLigBrep of *Leptospira interrogans* was performed and it was demonstrated it's application in diagnostic testing, using ELISA, for the detection of *Leptospira* in low pass (9:6) *Leptospira interrogans* cultivation isolated from serum experimentally infected animals. The limit of IgY anti-rLigBrep detection for bactéria was 10^1 (10) leptospire per ml, the standard deviation found (0.002828) shows that replicates are correlated. Since obtaining Immunoglobulin Y anti-rLigBrep is an ethical method, with a good amount of specific antibody obtained, by reducing the painful manipulations of animals and from the limit of detection, it was possible to demonstrate, in this study, that the use of IgY anti-rLigBrep in diagnostic tests for the detection of leptospirosis, presentes itself as an alternative that can be used with clinical samples, but further tests are needed for method confirmation.

Key-words: leptospirosis; diagnostic; immunoglobulin Y

Lista de Figuras

Figura 1	Regressão linear para curva de BCA	38
Figura 2	Gráfico de barras – Quantificação da IgY anti-rLigBrep	39
Figura 3	SDS-PAGE para avaliação da extração da IgY 1:100 das gemas dos ovos	40
Figura 4	SDS-PAGE para a visualização das amostras utilizadas para a realização da técnica de <i>Western Blotting</i>	40
Figura 5	<i>Western Blotting</i> para a caracterização da IgY anti-rLigBrep	41
Figura 6	Gráfico de Barras - Caracterização da IgY S3 anti-rLigBrep	42
Figura 7	SDS-PAGE para avaliação dos cultivos de baixa passagem produzidos	43
Figura 8-a	<i>Western Blotting</i> para avaliação quanto ao reconhecimento do soro hiperimune ao cultivo de <i>Leptospira interrogans</i> de baixa passagem	44
Figura 8-b	<i>Western Blotting</i> para avaliação quanto ao reconhecimento da IgY anti-rLigBrep ao cultivo de <i>Leptospira interrogans</i> de baixa passagem	44
Figura 8-c	<i>Western Blotting</i> para avaliação quanto ao reconhecimento do soro convalescente ao cultivo de <i>Leptospira interrogans</i> de baixa passagem	44
Figura 9	Gráfico de Barras – Avaliação do ELISA para Desenvolvimento de um Ensaio para a Detecção da Leptospirose	45

Lista de Abreviaturas e Siglas

AlOH ₃	Hidróxido de Alumínio
BCA	Ácido Bicinconínico
BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Constantes
CAVG	Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
cm/ave	Centímetro (s) da Ave
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
DDP	Diferença de Potencial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMJH	Ellinghausen – McCullough-Johnson-Harris
Fab	Fragmento de Ligação do Antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FCA	Adjuvante Completo de Freund
FIA	Adjuvante Incompleto de Freund
G	Grama (s)
H	Hora (s)
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
kDa	Quilodaltons
Lig	Proteínas de <i>Leptospira</i> Similares à Imunoglobulina
LigBrep	Proteínas de <i>Leptospira</i> Similares à Imunoglobulina - B – Porção Repetida
LigBni	Proteínas de <i>Leptospira</i> Similares à Imunoglobulina - Porção Não Idêntica
LIC	<i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni
<i>L. biflexa</i>	<i>Leptospira biflexa</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>L. parva</i>	<i>Leptospira parva</i>
LipL32	Lipoproteína de <i>Leptospira</i> de 32 kDa
MAT	Teste de Soroaglutinação Microscópica
mA	Miliampère
mg	Miligrama (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mM	Milimolar
N	Normal
Ng	Nanograma (s)
ng/poço	Nanograma (s) por Poço
ng/µl	Nanograma (s) por Microlitro
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PBS-T	Tampão Fosfato-Salino e Tween – 20
PEG	Polietilenoglicol

pH	Potencial de Hidrogênio
r	Recombinante
rpm	Rotações por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Sódio Dodecil Sulfato - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
S	Semana
S	Unidade de Svedberg
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
UBA	União Brasileira de Avicultura
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
w/v	Massa sobre Volume
V	Variáveis
V	Volts
X	Número de Vezes da Diluição
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
µg	Micrograma (s)
µg/ml	Micrograma (s) por Mililitro
µL	Microlitro (s)
µL/poço	Microlitro (s) por Poço
µm	Micrometro (s)
°C	Grau (s) Celsius

Sumário

1	Introdução	15
2	Objetivo Geral	17
2.1	Objetivos Específicos	17
3	Revisão de Literatura	18
3.1	<i>Leptospira</i> e Leptospirose	18
3.1.1	Patogênese e Proteínas	19
3.1.2	Diagnóstico para a Leptospirose	20
3.2	Soros Policlonais	21
3.2.1	Produção de Soros Policlonais	22
3.3	Imunoglobulina Y (IgY)	22
3.3.1	Estrutura da IgY	24
3.3.2	Imunização de Galinhas	25
3.3.2.1	Dose de Antígeno	25
3.3.2.2	Adjuvantes	25
3.3.2.3	Via de Aplicação do Antígeno	26
3.3.2.4	Raça e Linhagem Genética	26
3.3.3	Transferência Ativa da IgY do Soro para a Gema do Ovo das Galinhas	27
4	Materiais e Métodos	28
4.1	Aspectos Éticos	28
4.2	Produção de Imunoglobulina Y (IgY) anti-rLigBrep	28
4.2.1	Produção de IgY Policlonal anti-rLigBrep em Galinha	28

4.2.2	Avaliação da Produção de Soros Policlonais na Corrente Sanguínea da Galinha por ELISA (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>) Indireto	29
4.2.3	Obtenção dos Soros Policlonais IgY anti-rLigBrep	30
4.2.4	Quantificação e Especificidade das IgY Através do Método de Ácido Bicinconínico (BCA)	30
4.2.5	SDS-PAGE para Avaliação da Extração das IgY	31
4.2.6	SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> para Caracterização da IgY anti-rLigBrep	31
4.2.7	ELISA para Caracterização da IgY anti-rLigBrep	32
4.3	Desenvolvimento de um Ensaio para Detecção de Leptospirose na Fase Aguda	33
4.3.1	Cepas e Cultivo Utilizados no Teste de Soroaglutinação Microscópica	33
4.3.2	MAT para Titulação do Soro Hiperimune de Animal Infectado com <i>Leptospira spp.</i>	33
4.3.3	Preparação do Cultivo de Baixa Passagem (9:6) para Utilização em Testes Imunodiagnósticos	34
4.3.4	SDS-PAGE para Visualização dos Cultivos de <i>Leptospira interrogans sorovar Copenhageni</i> cepa Fiocruz L1-130	35
4.3.5	SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> para Avaliação do Reconhecimento da IgY anti-rLigBrep contra Cultivo de <i>Leptospira interrogans</i> de Baixa Passagem (9:6)	35
4.3.6	ELISA para Desenvolvimento de um Ensaio para a Detecção da Leptospirose	36
4.4	Análises Estatísticas	37

5	Resultados	38
5.1	Avaliação da Produção e Extração da IgY anti-rLigBrep	38
5.1.1	Avaliação do ELISA Indireto para a Produção de Soros Policlonais Utilizando Soro da Galinha Imunizada	38
5.1.2	Curva de BCA para Quantificação e Especificidade da IgY anti-rLigBrep	38
5.1.3	Quantificação das IgY anti-rLigBrep	39
5.1.4	SDS-PAGE para Visualização da Extração da IgY anti-rLigBrep Policlonal da Gema dos Ovos da Galinha Imunizada	39
5.1.5	SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> para Caracterização da IgY anti-rLigBrep	40
5.1.6	ELISA Indireto para a Caracterização da IgY S3 anti-rLigBrep	41
5.2	Avaliação de um Ensaio para Detecção da Leptospirose na Fase Aguda	42
5.2.1	MAT – Titulação do Soro Hiperimune	42
5.2.2	SDS-PAGE para Visualização dos Cultivos de <i>Leptospira</i> <i>interrogans</i>	42
5.2.3	<i>Western Blotting</i> para Avaliação da IgY s3 anti-rLigBrep quanto ao Reconhecimento do Cultivo de Baixa Passagem de <i>Leptospira interrogans</i>	43
5.2.4	ELISA Indireto	44
6	Discussão	46
7	Conclusão	49
	Referências	50

1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose bacteriana com distribuição mundial, a qual é causada por sorovares patogênicos do gênero *Leptospira spp.* (PICARDEAU *et al.*, 2014). A enfermidade, ocorre tanto em áreas urbanas como rurais, principalmente de países com clima tropical, onde a prevalência é elevada (KO *et al.*, 2009). Dentre os animais domésticos e sinantrópicos, os roedores são considerados os principais reservatórios do agente, devido a sua resistência a enfermidade, colonização renal persistente e pela capacidade de excreção intermitente da bactéria através da urina (FIGUEIRA *et al.*, 2011).

Em humanos, a leptospirose pode comprometer órgãos, como o fígado, pulmões e rins, podendo levar a apresentação de icterícia, síndrome hemorrágica pulmonar e insuficiência renal, respectivamente (GOARANT *et al.*, 2013; GOMES, 2015). Em animais, a leptospirose apresenta grande impacto econômico e social por levar a perdas econômicas na pecuária, devido a abortos, animais natimortos e pela extrema morbidade que esta enfermidade causa aos animais, levando a uma baixa na produção de leite, além de ser uma infecção inaparente, comprometendo a eficiência reprodutiva dos rebanhos (ELLIS, 2015).

Atualmente, os testes disponíveis para o diagnóstico da leptospirose humana e animal apresentam uma capacidade limitada para detectar os casos durante a fase aguda da infecção (HARTSKEERL *et al.*, 2011) além de apresentarem reações cruzadas com outras doenças, tais como dengue, hepatite e gripe (HARTSKEERL *et al.*, 2011).

O Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT), ainda é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose, no entanto, o MAT apresenta algumas importantes limitações como: (a) o requerimento de uma bateria de antígenos vivos em cultura; (b) a necessidade de amostras pareadas de soro, sendo uma da fase aguda da infecção e outra da fase convalescente; (c) a baixa sensibilidade de detecção do antígeno na fase aguda da doença; (d) além da subjetividade da interpretação dos resultados devido à aglutinação (OMS, 2013). Dessa forma, surge a necessidade do desenvolvimento de novos testes diagnósticos que apresentem sensibilidade na fase aguda da doença, que sejam rápidos e de execução simples.

Nos últimos anos, esforços para a identificação de componentes imunogênicos da *Leptospira spp.* têm sido realizados. Houve a identificação de um grupo de proteínas antigênicas, as quais são reconhecidas durante as fases aguda e convalescente da leptospirose. Este grupo foi denominado de *Leptospiral Immunoglobulin -Like* (Lig) (MATSUNAGA *et al.*, 2003), onde a proteína LigB foi identificada como uma molécula de adesão envolvida na patogenicidade da doença, sendo conservada entre as espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. (FIGUEIRA, 2011). CERQUEIRA *et al.* (2009) demonstraram que a proteína LigB está ubiquamente distribuída entre as cepas patogênicas do gênero *Leptospira*, e por conseguinte, revela-se com um grande potencial para o desenvolvimento de testes diagnósticos e de vacinas recombinantes contra leptospirose.

A Imunoglobulina Y (IgY) é o principal anticorpo produzido por galinhas (*Gallus domesticus*) (GUIMARÃES, 2005), sendo encontrada em maior quantidade nas gemas dos ovos das aves. Dessa forma, a produção de IgY constitui-se em um método rápido e diário para a sua obtenção, onde há a redução do número de animais utilizados, não necessitando de eutanásia dos animais, uma vez que uma alta quantidade de anticorpos é possível de ser obtida através da gema dos ovos das galinhas imunizadas, dessa forma não interferindo no bem-estar do animal, sendo um método de baixo custo e de fácil execução (SCHADE *et al.*, 1996; KARLSSON *et al.*, 2004). Recentemente, VASCONCELLOS e colaboradores (2010) desenvolveram anticorpos policlonais IgY contra *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 que foram aplicados em diferentes formatos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de captura de antígeno, os quais foram capazes de detectar pequenas concentrações desta bactéria em soros humanos experimentalmente contaminados.

Neste contexto, a hipótese deste trabalho foi: “Anticorpos policlonais IgY contra a proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) reconhecem a proteína nativa em *Leptospira interrogans* e podem ser empregados em um teste que vise a detecção do agente em amostras experimentalmente contaminadas”.

2 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar a IgY contra a proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) da cepa L1-130 de *L. interrogans* Copenhageni.

2.1 Objetivos Específicos

- Imunizar galinhas com rLigBrep para a obtenção de anticorpos policlonais IgY;
- Caracterizar os anticorpos quanto a sua especificidade ao antígeno nativo através de *Western Blotting* e ELISA;
- Testar um formato de teste diagnóstico para a detecção da *Leptospira interrogans* em amostras experimentalmente contaminadas;

3 Revisão de Literatura

3.1 *Leptospira* e Leptospirose

Leptospiras são espiroquetas, patogênicas ou saprófitas, que apresentam um diâmetro de 0,1 µm e comprimento de 6-20 µm. Elas pertencem a família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*, o qual é composto por 23 espécies e mais de 300 sorovares, sendo mais de 260 patogênicos (ADLER *et al.*, 2010; CERQUEIRA *et al.*, 2009; GOMES, 2013; MONTE, 2009). As espécies patogênicas do gênero *Leptospira* colonizam o túbulo renal de roedores causando infecções com risco de vida tanto em animais quanto em hospedeiros acidentais, incluindo humanos, a esta infecção dá-se o nome de leptospirose (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Além de roedores, cães, gados, porcos, ovelhas, pequenos marsupiais, dentre outros também comportam-se como hospedeiros desta bactéria (HUMPHRYES *et al.*, 2014).

A leptospirose é uma importante doença infecciosa endêmica de caráter zoonótico que ocorre primeiramente em áreas rurais, ou urbanas de países subdesenvolvidos, ou em desenvolvimento, com clima tropical e sub-tropical, afetando os animais domésticos, silvestres e o homem (CORRÊA *et al.*, 2004; DELLAGOSTIN *et al.*, 2011). Mesmo apresentando caráter crônico e impacto no desenvolvimento de crianças e na gravidez, essa enfermidade ainda não se encontra bem documentada no mundo, sendo considerada uma doença subdiagnosticada e negligenciada (HOTEZ *et al.*, 2006). A OMS estima que se tenha 873.000 casos anuais graves culminando em 49.000 mortes por leptospirose (PICARDEAU *et al.*, 2014).

A via de infecção primária desta doença, em humanos, se dá através do contato direto com a urina de animais selvagens ou domésticos ou exposição à solo ou água contaminados. Em animais a transmissão pode se dar de animal para animal, em humanos se têm alguns pequenos relatos deste tipo de transmissão, no entanto ela não é considerada como um risco. Já a via de entrada no hospedeiro incluem a ingestão ou inalação por aerossóis e a entrada direta da bactéria para a corrente sanguínea através de cortes sobre a pele (BHARTI *et al.*, 2003; DELLAGOSTIN *et al.*, 2011; FAINE *et al.*, 1999; HUMPHRYES *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2004; PHRAISUWAN *et al.*, 2002).

3.1.1 Patogênese e Proteínas

As bactérias do gênero *Leptospira* são altamente invasivas e podem infectar um amplo número de hospedeiros, levando a apresentação de um amplo espectro de manifestações clínicas em humanos, tais como disfunção renal, disfunção hepática caracterizando-se pela icterícia, miocardite e nos casos mais graves pode levar a síndrome hemorrágica pulmonar e a meningite. Já em animais observa-se o aparecimento de abortos, animais natimortos, baixa na produção de leite, problemas reprodutivos, dentre outros (AVILA *et al.*, 1998; BHARTI *et al.*, 2003).

O rato (*Rattus norvegicus*) apresenta-se como o principal hospedeiro da *Leptospira*, abrigando as bactérias no túbulo renal e liberando-as através da urina. As leptospirosas patogênicas apresentam alta motilidade e podem invadir organismos e se disseminar rapidamente aos órgãos-alvo, após a entrada no hospedeiro. Estes organismos, por sua vez produzem uma resposta imunológica humoral contra esta bactéria, no entanto ela tem a capacidade de colonizar e persistir no túbulo renal, evadindo a resposta imune (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Análises filogenéticas de 16S rRNA sugerem que as diferentes espécies do gênero *Leptospira* estão divididas em três grupos, as saprófitas (não patogênicas), patogênicas e intermediárias (GOMES, 2013).

Originalmente (antes de 1987), o gênero *Leptospira* possuía três espécies, a *Leptospira biflexa* (*L. biflexa*), *Leptospira interrogans* e *Leptospira parva* (*L. parva*). Estudos posteriores, baseados na hibridação DNA-DNA, modificaram a taxonomia até então conhecida da *Leptospira*, chegando, hoje, nas 23 espécies conhecidas, de acordo com LPSNbacterio.net (GOMES, 2013).

Até o momento, diversos fatores de patogenicidade e evasão do sistema imune, competentes a esta bactéria, têm sido estudados. Nos últimos anos, o genoma de três espécies patogênicas e uma saprófita foram sequenciados. Sendo a *L. interrogans* a maior causadora da leptospirose urbana, identificou-se que cerca de 1200 genes desta espécie podem estar associados a virulência dessas leptospirosas (FIGUEIRA, 2011; MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Recentemente, se teve a identificação de genes Lig, LigA, LigB e LigC que são considerados fatores determinantes para codificação da virulência em estirpes patogênicas caracterizando-se por serem expressos na superfície da membrana da

bactéria e com funções de adesinas relevantes para a patogênese microbiana, tais como a intimina e invasinas em *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pseudotuberculosis*), respectivamente (CHOY *et al.*, 2007).

A expressão da LigA e LigB é controlada por osmolaridade, aumentando a ligação da bactéria a célula hospedeira, estes dados indicam que as proteínas Ligs são cruciais para os fatores de virulência da *Leptospira spp.* patogênica (LIN *et al.*, 2007). A molécula LigB, por sua vez, apresenta como diferencial ser conservada entre todas as espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo por isso um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes, bem como de testes diagnósticos para a detecção da leptospirose (FIGUEIRA, 2011).

3.1.2 Diagnóstico para a Leptospirose

O Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT), é reconhecido pela OMS (2013), como referência no diagnóstico sorológico da leptospirose. Este teste baseia-se na coleta de soros de pacientes na fase aguda da doença e na reação de aglutinação da amostra com uma bateria de antígenos de diferentes sorovares do gênero *Leptospira*, vivos em cultura. Após o período de incubação, a mistura dos soros com os antígenos é observada microscopicamente para a verificação da aglutinação e os títulos são determinados. No entanto, o MAT apresenta-se como um teste complexo para controlar, executar e interpretar, além de ser laborioso, exigindo bons equipamentos e uma equipe treinada. Além disso o MAT apresenta uma série de importantes limitações, tais como o requerimento de uma ampla bateria de antígenos vivos em cultura, dificultando a realização do teste, podendo haver a contaminação cruzada das culturas de antígenos, sendo necessária a verificação constante dos sorovares. Além disso, o requerimento de um painel de soros pareados com a coleta de soros na fase aguda e convalescente da doença, quando muitas vezes o paciente ou já foi a óbito ou já teve alta, a baixa sensibilidade do teste na fase aguda da doença e a subjetividade da interpretação dos resultados devido a aglutinação (HARTSKEERL *et al.*, 2011; LEVETT, 2001).

A leptospirose apresenta-se comumente subdiagnosticada, uma vez que seus sintomas são similares a outras doenças, como dengue, malária e gripe. Além disso, os testes laboratoriais existentes apresentam baixa sensibilidade na fase aguda da

infecção, sendo aplicáveis somente numa fase avançada da doença quando o tratamento com antibiótico apresenta altas chances de falhar, sendo necessário o surgimento de novos testes para a detecção da leptospirose humana e animal (HARTSKEERL *et al.*, 2011; MCBRIDE *et al.*, 2005).

3.2 Soros Policlonais

Anticorpos são proteínas encontradas no plasma e em fluídos extracelulares que atuam como a primeira resposta imunológica, sendo moléculas de grande importância no sistema imune adaptativo. Estas moléculas são produzidas em resposta a antígenos e imunógenos, normalmente fazendo a neutralização ou a eliminação destes agentes estranhos (LIPMAN *et al.*, 2005).

Os anticorpos tanto monoclonais quanto os soros policlonais apresentam grande valor em pesquisas biológicas, sendo componentes essenciais de uma variedade de diagnósticos tanto quantitativos quanto qualitativos, determinando uma gama de substâncias. Além disso, estas proteínas têm sido utilizadas como ferramentas terapêuticas importantes no tratamento de doenças. Suas aplicações incluem a análise, purificação, enriquecimento e modulação de respostas fisiológicas. (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHADE *et al.*, 1996).

Os soros policlonais são produzidos utilizando animais de laboratório, principalmente, mamíferos podendo-se citar os coelhos, camundongos, equinos, bovinos e ovinos e mais recentemente se tem a utilização de não mamíferos, como as aves, principalmente, galinhas (VASCONCELOS, 2010). Por sua vez, a utilização de aves para a produção de anticorpos representa o refinamento da técnica e a redução do número de animais utilizados (SCHADE *et al.*, 1996).

A seleção de espécies é uma consideração relevante, quando se trata da imunização de mamíferos com proteínas, uma vez que espécies filogeneticamente diferentes irão gerar anticorpos para uma maior variedade de epítomos do que espécies estreitamente relacionadas (LIPMAN *et al.*, 2005).

3.2.1 Produção de Soros Policlonais

O sistema imunológico dos mamíferos é composto por milhares de linfócitos, essa variedade de células permite ao sistema imunológico uma resposta a uma ampla variedade de imunógenos, como por exemplo proteínas, hidratos de carbono, peptídeos e componentes bacterianos e virais. (LEENARS *et al.*, 1999).

Ao contrário dos anticorpos monoclonais, os soros policlonais reconhecem epítopos múltiplos, sendo o impacto da mudança conformacional do anticorpo no processo de produção, de menor preocupação quando comparados à monoclonais (LIPMAN *et al.*, 2005).

Sua produção é baseada na imunização do modelo animal escolhido com o antígeno que se deseja obter uma resposta imune humoral. O antígeno utilizado para a imunização do animal, interage com o anticorpo, mais precisamente, com o Fragmento de Ligação ao Antígeno (Fab), que contém domínios variáveis com sítios de ligação do antígeno. Os linfócitos B, por sua vez, medeiam a resposta e se diferenciam em anticorpos específicos a este antígeno e células B de memória. As células B de memória, ao entrarem em contato com o antígeno a que são específicas, atuam com alta avidéz e afinidade. (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHADE *et al.*, 1996).

Sendo a maioria dos antígenos complexos, eles apresentam um grande número de epítopos que são reconhecidos por linfócitos, cada linfócito é ativado e prolifera-se e diferencia-se em células do plasma, sendo o soro resultante, policlonal, reconhecendo uma vasta gama de epítopos de um mesmo antígeno (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHADE *et al.*, 1996; VASCONCELOS, 2010).

3.3 Imunoglobulina Y (IgY)

A Imunoglobulina Y é o principal anticorpo encontrado nas aves, principalmente nas gemas dos ovos das galinhas (*Gallus domesticus*) (GUIMARÃES, 2005), além de ser encontrada nesta espécie também está presente em anfíbios, répteis e alguns peixes pulmonados (MUNHOZ *et al.*, 2014).

Em 1893, KLEMPERER demonstrou que ao imunizar um grupo de galinhas diversas vezes, utilizando toxina tetânica não purificada, os anticorpos gerados eram transferidos para as gemas dos ovos. Entretanto, não existiu aplicação científica com

estes anticorpos por um longo período. No entanto, nas últimas décadas o bem-estar dos animais tem se tornado mais importante e relevante e vem sendo cada vez mais discutido mundialmente (DA ROCHA, 2010).

Em 1980, a IgY passou a ter uma aplicação mais ampla no meio científico, principalmente devido a disponibilidade de reagentes comerciais, tais como kits de purificação de IgY e conjugados de anticorpos já conhecidos (fosfatase alcalina, isoticianato de fluoresceína e peroxidase) especificamente contra IgY (SCHADE *et al.*, 2012).

Em 1996, o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) recomendou, em seu *workshop*, a utilização da Tecnologia da IgY (termo introduzido por Claus Staak em 1995) como método alternativo para a produção de anticorpos, por ser apresentado como um refinamento de um técnica existente, pela redução do números de animais utilizados e por não ser um método invasivo, diminuindo o manejo doloroso dos animais (SCHADE *et al.*, 1996). A validação e aprovação desta tecnologia veio em 1999 pelo Office Vétérinaire Federal (Escritório Veterinário Federal do Governo Suíço), sendo considerado um método alternativo que visa o bem-estar animal (SCHADE *et al.*, 2005).

Em humanos, encontra-se cinco classes de imunoglobulinas: Imunoglobulina A (IgA), IgM, IgG, IgD e IgE, entretanto em aves apenas 3 classes foram identificadas (IgM, IgA e IgY). A IgM e IgA de aves se assemelham a IgM e IgA de mamíferos tanto no seu peso molecular quanto na sua estrutura e mobilidade eletroforética (SCHADE *et al.*, 2005).

Inicialmente a IgY foi descrita como sendo semelhante a Imunoglobulina G (IgG) de mamíferos e até denominada como tal, devido a sua estrutura, a sua concentração presente no soro e por estar envolvida na resposta imune secundária de forma similar a IgG, entretanto isso torna-se inapropriado, principalmente devido a suas diferenças estruturais fundamentais entre IgY e IgG. Atualmente sabe-se que as sequências de DNA dos genes que codificam a IgY são mais similares com os genes que codificam para IgE do que quando comparados a IgG de mamíferos, além disso se tem uma similaridade entre IgY e IgA de mamíferos. Assim pode-se dizer que a IgY é um ancestral evolutivo da IgA, IgE e IgG de mamíferos, no entanto a IgY apresenta em contraste com a IgG poder mediar reações anafiláticas (SCHADE *et al.*, 2005).

As Imunoglobulinas Y apresentam uma série de vantagens quando comparadas a anticorpos de mamíferos. Os anticorpos de galinha podem ser utilizados para a redução de resultados falso-positivos, uma vez que eles não reagem com fatores reumatoides, ou anticorpos IgG de humanos produzidos em ratos que estão contidos nas amostras, além disso a IgY não ativa e nem reage com o sistema complemento, não se fixa a proteínas bacterianas A (*Staphylococcus*) e G (*Streptococcus*) que são frequentemente encontrados em amostras clínicas e não interage com receptores do Fragmento Cristalizável (Fc) de mamíferos, reduzindo as interferências nos resultados (GASSMANN *et al.*, 1990; LARSSON *et al.*, 1992; LARSSON *et al.*, 1991).

3.3.1 Estrutura da IgY

A IgY, assim como a IgG de mamíferos possui duas cadeias polipeptídicas leves (18,660 kDa) e duas pesadas (65,105 kDa), sendo compostas por porções variáveis (V) e constantes (C). As cadeias leves apresentam um domínio variável e um constante, já as cadeias pesadas apresentam um domínio variável e quatro constantes, contrastando com os três domínios constantes da cadeia pesada da IgG de mamífero (DA SILVA *et al.*, 2010; GUIMARÃES, 2005).

Assim como as imunoglobulinas de mamíferos, a porção Fab da IgY apresenta sítios para reconhecimento de antígenos, já a porção Fc na IgY, da mesma forma que na IgG de mamíferos, é o local que se concentram as maiores funções efetoras do anticorpo (DA SILVA *et al.*, 2010).

No entanto, por apresentar uma região de interdomínios, ou dobradiça, menor, a IgY acaba apresentando uma menor flexibilidade da porção Fab frente aos antígenos, podendo ser esta, uma das razões para algumas diferenças apresentadas entre IgY e IgG referentes ao reconhecimento de antígenos (SCHADE *et al.*, 2005). Além disso, a IgY apresenta como diferencial ser uma molécula grande (em torno de 180 kDa) e não apresenta reação cruzada com IgG de mamíferos (MUNHOZ *et al.*, 2014).

3.3.2 Imunização de Galinhas

Não é possível determinar os resultados do desenvolvimento e produção de anticorpos, com precisão, a partir da imunização de um animal. No entanto, se tem conhecimento de quatro fatores que podem estar ligados ao desenvolvimento de uma resposta imune em galinhas imunizadas, dessa forma devem ser levados em consideração a dose do antígeno, o adjuvante utilizado, a via de aplicação e a galinha (idade, linhagem, condições de manejo, dentre outros fatores) (DA ROCHA, 2010).

3.3.2.1 Dose de Antígeno

A utilização de pequenas quantidades de antígeno para a imunização, muitas vezes, é de extrema importância, devido a quantidade limitada disponível de antígeno, a disponibilidade do antígeno no mercado e o preço que em muitos casos é elevado. Além disso as possibilidades de obtenção de anticorpos não específicos aumentam com a imunização utilizando altas doses de antígeno (LARSSON *et al.*, 1998).

LARSSON e colaboradores (1998) demonstraram que é possível obter uma elevada resposta imunológica utilizando pequenas quantidades de antígeno. A imunização de galinhas poedeiras da raça *White Leghorn* foi realizada utilizando o antígeno Albumina Sérica Bovina (BSA) nas quantidades de 100 µg, 10 µg, 1 µg e 0,1 µg. As imunizações com as quantidades 100 µg, 10 µg e 1 µg demonstraram produzir uma elevada resposta imunológica e a imunização com 0,1 µg mostrou um título detectável de anticorpos.

3.3.2.2 Adjuvantes

A produção de soros policlonais é facilitada pela utilização de potencializadores de respostas imunes, tais como os adjuvantes. Entretanto, esta estimulação não depende do antígeno, melhorando a magnitude da resposta imune (SCHADE *et al.*, 2005). CALZADO e colaboradores (2001) demonstraram que a imunização de animais, sem o adjuvante é capaz de produzir títulos aceitáveis de anticorpos.

Há diversos adjuvantes que diferem quanto as suas características químicas, eficácia na estimulação da resposta imune e efeitos adversos relacionados a

inoculação em galinhas (LEENARS *et al.*, 1999). Segundo SCHADE e colaboradores (2005), o Adjuvante Completo de Freund (FCA), demonstra-se como sendo o mais efetivo, entretanto, sua eficácia está relacionada ao dano potencial causado ao tecido. O Adjuvante Incompleto de Freund (FIA), é menos eficaz quando comparado ao FCA, mas os resultados apresentam efeitos colaterais menores.

Novos adjuvantes que apresentem alta eficácia, como o FCA, mas que não causem sérios efeitos colaterais nas aves, têm sido estudados (SCHADE *et al.*, 2005). Recentemente, MARCQ e colaboradores (2015), demonstraram que quando utilizado o adjuvante MONTANIDE ISA 70 VG, para a imunização de galinhas, em comparação aos adjuvantes de Freund (FA), as aves imunizadas com MONTANIDE apresentaram menores efeitos colaterais severos do que com o FA, no entanto ainda assim algumas lesões foram observadas nas aves. DUNGU e colaboradores (2009), demonstraram que ao utilizarem como adjuvante o MONTANIDE ISA 206 VG e o MONTANIDE ISA 70 VG, as aves imunizadas com ISA 206 apresentaram reações menos graves à vacinação. Isto pode ser explicado devido ao fato de que o ISA 206, apresentava fase contínua aquosa, dessa forma reduzindo a reação inflamatória local, quando comparado ao outro adjuvante testado, que apresentava água em emulsões de óleo (JANSEN *et al.*, 2006).

3.3.2.3 Via de Aplicação do Antígeno

A via mais utilizada para imunização de aves poedeiras é a intramuscular. O uso de adjuvantes pela via intravenosa, não é permitido (DA ROCHA, 2010). A via oral também pode ser utilizada para a aplicação de antígenos (KLIPPER *et al.*, 2001). KLIPPER e colaboradores (2001), demonstraram que a imunização oral de aves com BSA, seja por cápsulas de gelatina, agulha de alimentação ou água potável, induziu uma alta titulação de anticorpos em soros de aves adultas.

3.3.2.4 Raça e Linhagem Genética do Animal

A concentração de IgY na gema varia de acordo com o indivíduo, sendo a linhagem genética e a raça fatores determinantes. Como modelo animal para produção de IgY, são indicadas duas raças de galinhas, a *White Leghorn Single Comb*

e a *Rhode Island Red* (CARLANDER *et al.*, 2002; GROSS *et al.*, 1990). PAULY e colaboradores (2011), afirmam que a quantidade de IgY contida no ovo é dependente da idade da galinha.

3.3.3 Transferência Ativa da IgY do Soro para a Gema do Ovo das Galinhas

Em galinhas jovens, a secreção de IgY tem início em seis dias após a eclosão do ovo (DA SILVA *et al.*, 2010). Em se tratando de imunização, a IgY passa a ser produzida na corrente sanguínea do animal, após quatro dias da inoculação do antígeno, chegando a maior titulação entre o sexto e o oitavo dia. Após a primeira imunização, observa-se, na primeira fase um incremento passageiro na produção de IgY, na segunda fase há um incremento inicial na produção deste anticorpo, tendo duração de 10 dias, seguidos por um platô de 10 dias, mantendo-se uma titulação constante e decaindo posteriormente. Galinhas poedeiras especializadas, apresentam uma capacidade de produção de ovos superior a 10 meses, possibilitando a obtenção de grandes quantidades de IgY específica contra determinado antígeno (DA ROCHA, 2010).

Após 36 a 65 horas da inoculação do antígeno, a IgY circulante é transferida do soro do animal, via transovariana para a gema dos ovos, através de receptores presentes na superfície da gema, este processo pode levar até cinco dias, devido à passagem não só de IgY, mas de outras proteínas também (MOHAMMED *et al.*, 1998; MUNHOZ *et al.*, 2014). MORRISON e colaboradores (2002), afirmam que a quantidade de IgY transferida para a gema do ovo, é dependente da concentração sérica e aparentemente toda a população de IgY é transferida, no entanto WOOLLEY e colaboradores (1995), detectaram uma alta concentração de IgY na gema, sendo de 1.23 vezes maior na gema do que no soro.

A concentração estimada de IgY na gema do ovo pode variar de 100 a 200 mg por ovo (GUIMARÃES, 2005). Sendo assim, em comparação, uma galinha poedeira, produz consideravelmente mais anticorpos do que um coelho durante um período de tempo similar (LARSSON *et al.*, 1998).

4 Materiais e Métodos

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), processo 23110.004654/2010-41. Os animais que serão utilizados neste projeto foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo protocolo de Bem-Estar para Poedeiras, da União Brasileira de Avicultura (UBA).

4.2 Produção de Imunoglobulina Y (IgY) anti-rLigBrep

4.2.1 Produção de IgY Policlonal anti-rLigBrep em Galinha

Uma galinha (*Gallus domesticus*) poedeira da raça *Leghorn*, de 29 semanas de idade, foi selecionada e alocada no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG), com sede na cidade de Pelotas – Rio Grande do Sul, com umidade e ventilação controladas. O programa de luz seguiu o recomendado pelo manual da linhagem, o alimento foi fornecido através de comedouro tipo calha, localizado dentro do cercado, com mais de 10 cm/ave. A ave teve livre acesso à água através de um bebedouro tipo *nipple*.

Para a obtenção do soro policlonal, foram realizadas quatro vacinações, com proteínas obtidas por estudos anteriores, no intervalo de 14 dias cada, sendo elas nos dias 0, 14, 28 e 42, via intramuscular. Cada dose possuía 100 µg de proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) (VASCONCELLOS *et al.*, 2010), adsorvidas em 400 µL de adjuvante Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃), totalizando 500 µL de volume por dose.

Em torno, de 4 a 5 ovos da galinha imunizada foram coletados por semana durante 10 semanas.

4.2.2 Avaliação da Produção de Soros Policlonais na Corrente Sanguínea da Galinha por ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) Indireto

Para a realização do ELISA, foram coletadas amostras de sangue da ave, através de punção da veia ulnar, sendo coletado em média 3 ml. As coletas das amostras sanguíneas foram realizadas sempre anteriormente às vacinações dos dias 14, 28 e 42.

Para avaliar a resposta da produção de anticorpos circulantes na corrente sanguínea do animal, foi realizada a separação do soro através da centrifugação das amostras a 3000 rpm por 5 min. Os soros foram retirados, transferidos para microtubos de 1,5 ml, do tipo *ependorfs*, e avaliados quanto à produção de anticorpos por ELISA indireto.

A placa de ELISA (96 poços) foi sensibilizada com a proteína rLigBrep. A placa foi armazenada a 4 °C *overnight*. Posteriormente, se fez a lavagem da placa 3 vezes consecutivas com PBS-T (Tampão Fosfato-Salino e Tween 20) e adicionou-se solução de bloqueio (Leite desnatado em pó - Molico 5% e PBS-T) em 10 poços. A placa foi incubada a 37 °C por 1 h. Ao final deste período, a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T e fez-se a adição dos soros da galinha imunizada com rLigBrep.

Os soros dos dias 14, 28 e 42 foram diluídos em PBS-T (1:100) e adicionados em duplicata na placa. O controle negativo, realizado em duplicata, teve somente a adição de PBS 1x. O controle positivo, realizado em duplicata, teve a adição de soro (1:100) de hamster convalescente de leptospirose. Após este procedimento, a placa foi novamente incubada durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se fez a lavagem, 3 vezes com PBS-T.

O anticorpo anti-*chicken*, produzido em coelho conjugado à enzima peroxidase, foi utilizado como anticorpo secundário para os poços que continham os soros da galinha imunizada e para o controle negativo. O anticorpo secundário foi utilizado na diluição 1:4000 e adicionado ao poço.

O controle positivo foi testado com anticorpo anti-hamster 1:8000. A placa foi incubada por 1 h a 37 °C e foi realizada a lavagem 5 vezes consecutivas com PBS-T.

Para a revelação foi adicionado à placa a solução: 5 ml de solução de revelação (tampão fosfato-citrato), 0,005 g de Ortofenilenodiamina (OPD) e 5 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A placa foi protegida da luminosidade com papel alumínio e

incubada por 15 min, a temperatura ambiente. Após este período, a reação foi parada com Ácido Sulfúrico 4N, sendo a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Biochrom EZ Read 400) a 492 nm.

4.2.3 Obtenção dos Soros Policlonais IgY anti-rLigBrep

A extração de IgY total da gema foi realizada através do método de precipitação por polietilenoglicol (PEG 6000) (PAULY *et al.*, 2011, SCHADE, *et al.*, 2005). Um separador de gemas com o auxílio de um papel filtro foi utilizado para que fosse realizada a separação da clara da gema dos ovos. A maior quantidade de clara foi retirada e descartada e as gemas foram separadas e agrupadas por semanas em tubos do tipo *Falcon* de 50 ml. Cada *pool* de gemas foi homogeneizado em PBS 1x e adicionados de PEG na concentração de 3,5% (w/v), seguidos por 10 min de agitador de rolos e posteriormente centrifugadas por 20 min, 10.000 rpm, a 4 °C, separando assim a solução em duas fases: uma contendo a gema juntamente com os lipídeos e a outra, uma fase aquosa, contendo os anticorpos. O sobrenadante foi filtrado e repetiu-se o processo por mais 2 vezes utilizando concentrações crescentes de PEG, 8,5% (w/v) e 12% (w/v). No entanto, na última centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em PEG, afim de que fosse extraída a maior quantidade possível dos anticorpos da gema. O *pellet* restante foi dissolvido PBS 1x, completando o volume final para a diálise. O extrato foi dialisado *overnight* em solução salina 0,1% seguido por mais 3 horas de diálise em PBS 1x. As amostras foram estocadas a -20 °C até o uso.

4.2.4 Quantificação e Especificidade das IgY Através do Método de Ácido Bicinconínico (BCA)

Foram adicionados 25 µl de cada uma das soluções padrão de BSA em uma placa *multiwell* de 96 poços. Utilizou-se 25 µL de diluente para fazer o ponto zero da curva padrão. Adicionou-se o volume de 25 µL das proteínas IgY anti-rLigBrep correspondentes as 10 semanas coletadas. Foi adicionado 200 µL do reagente BCA, agitando a placa em um agitador orbital durante 30 segundos. Cobriu-se a placa e após a mesma foi incubada a 37 °C durante 30 min. A aferição da absorbância foi

realizada a 562 nm, sendo construída a curva padrão, representada em um gráfico a 562 nm de cada uma das soluções padrão vs. a sua concentração de proteína em ng/ μ L.

A concentração das IgY foi mensurada através de quantificação por espectrofotometria a 562 nm com coeficiente de extinção de 1,33.

4.2.5 SDS-PAGE para Avaliação da Extração das IgY

Dez amostras, sendo elas o *pool* de IgY Semana 1 (S1), S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, foram diluídas em PBS 1x, sendo 1 μ L de IgY para 99 μ L de PBS 1x, juntamente com o marcador de peso molecular (Amersham ECL), a proteína rLigB 7-11 e a IgY anti-LipL32, foram separadas em 20 μ L cada, em tubos do tipo *ependorf* de 1,5 ml, e acrescidas de 5 μ L de tampão de amostra (SDS 5%), exceto o marcador pré-corado. As amostras foram aquecidas em banho seco a 100 °C durante o período de 10 min. Para a corrida, 20 μ L de cada amostra, com exceção do marcador (5 μ L), foram aplicados em um gel de poliacrilamida 12 % e separados eletroforeticamente, a DDP (diferença de potencial elétrico) foi ajustada para 80 V e corrida por 40 min, posteriormente a DPP foi elevada para 120 V e a corrida se deu por mais 1 h 20 min, sendo a corrente mantida a 400 mA por toda a duração da corrida. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi corado com solução de *Comassie Blue overnight* e descorado com Solução Descorante (Ácido Acético 10%, Metanol 25% e Água destilada).

4.2.6 SDS-PAGE e *Western Blotting* para Caracterização da IgY anti-rLigBrep

Seis amostras, sendo elas o marcador de peso molecular, a IgY anti-rLigBrep S3 1:100, a IgY anti-rLigBrep S3 1:50, a proteína nativa LigBrep de *Leptospira interrogans sorovar Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130 na diluição 1:100, a proteína rLigBni 1:50 e a proteína recombinante LIC 11207 foram preparados e separadas eletroforeticamente, em dois géis contendo as mesmas amostras, de acordo com o processo citado acima.

Após a corrida, um dos géis foi corado com solução de *Comassie Blue overnight* e descorado com Solução Descorante. O outro gel foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose de 0.45 μ m (GE *Healthcare Life Science* – Amersham

Protran) a uma DDP de 140 V e corrente de 400 mA pelo período de 50 min. Após este procedimento, a membrana foi bloqueada para reações inespecíficas com solução de bloqueio 5% e incubada *overnight* a 4 °C sob agitação. A membrana foi lavada por 3 vezes consecutivas com PBS-T e a IgY anti-rLigBrep na diluição 1:50 com proporção 1:50, utilizada como anticorpo primário, adicionada na membrana e incubada 1 h a temperatura ambiente em *shaker* horizontal. Foi realizada a lavagem da membrana por 3 vezes com PBS-T e adicionado o anti-*chicken* conjugado a enzima peroxidase na proporção 1:4000, o processo de incubação foi repetido. Por fim, a membrana foi lavada 5 vezes consecutivas com PBS-T e revelada com solução de revelação por Diaminobenzidina (DAB), H₂O₂, Tris HCl pH 7,6 50 mM e Sulfato de Níquel 0,3%.

4.2.7 ELISA para Caracterização da IgY anti-rLigBrep

A placa de ELISA (96 poços) foi sensibilizada com 50, 100 e 200 ng/poço de proteína nativa LigBrep (utilizada anteriormente nos géis de SDS-PAGE).

Para a sensibilização com 50 ng de proteína nativa fez-se a diluição da proteína. Adicionou-se 0,44 µL de LigBrep em 2500 µL de solução de sensibilização (tampão carbonato-bicarbonato), se fez a homogeneização da amostra em vórtex e foi aplicado a amostra na placa. A sensibilização com 100 ng e 200 ng de proteína seguiu o mesmo padrão citado acima, no entanto se fez a diluição com 0,89 µL e 1,78 µL de LigBrep, respectivamente. O controle negativo e positivo foi realizado em duplicata e foi sensibilizado com LigBrep. A placa de 96 poços foi armazenada a 4 °C *overnight*. Posteriormente, se fez a lavagem da placa 3 vezes consecutivas com PBS-T e adicionou-se solução de bloqueio 5% nos poços sensibilizados com a proteína. A placa foi incubada em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 37 °C por 1 h. Ao final deste período, a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-T.

A IgY anti-rLigBrep S3 bruta foi diluída em 700 µL de PBS-T para 14 µL de anticorpo e adicionada na forma de diluição seriada (1:50 a 1:25600) em todos os poços, exceto no controle positivo e negativo.

No controle negativo se fez a adição de PBS-T como anticorpo primário. No controle positivo se fez a adição de soro anti-LigBrep cepa Fiocruz na diluição 1:100, sendo 2,5 µL de soro para 200 µL de PBS-T. A placa foi, novamente, incubada por 1

h a 37 °C. Após este período, se realizou a lavagem da placa por 3 vezes com PBS-T.

O anticorpo anti-*chicken* produzido em coelho conjugado a enzima peroxidase foi utilizado como anticorpo secundário para os poços que continham como anticorpo primário a IgY anti-rLigBrep e para o controle negativo. O anticorpo secundário foi utilizado na diluição 1:4000 e adicionado na placa.

O controle positivo foi testado com anticorpo anti-hamster conjugado à enzima peroxidase 1:8000. A placa foi incubada por 1 h a 37 °C e foi realizada a lavagem 5 vezes consecutivas com PBS-T.

Para a revelação foi adicionado à placa a solução: solução de revelação, OPD e H₂O₂. A placa foi protegida da luminosidade com papel alumínio e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi parada com 100 µL/poço de Ácido Sulfúrico 4N. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (*Biochrom EZ Read 400*) a 492 nm.

4.3 Desenvolvimento de um Ensaio para Detecção de Leptospirose na Fase Aguda

4.3.1 Cepas e Cultivo Utilizados no Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT)

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi cultivada em meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco, Estados Unidos da América), enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco, Estados Unidos da América). O cultivo foi mantido em estufa BOD de 28 °C a 30 °C, até a sua utilização.

4.3.2 MAT para Titulação do Soro Hiperimune de Animal Infectado com *Leptospira spp.*

O Teste de Soroaglutinação Microscópica foi realizado segundo FAINE e colaboradores (1999), utilizando com antígeno a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130.

Para a realização do MAT, a *Leptospira* foi cultivada em meio comercial EMJH (Difco *laboratories*) líquido, em uma temperatura de 29 °C e repicadas a cada sete dias. Para a padronização do antígeno, utilizou-se a câmara de Petroff-Hausser, ajustando a concentração em 1 a 2×10^8 Leptospiras por ml. No primeiro poço de uma placa de 96 poços aplicou-se PBS 1x e a cultura de *Leptospira interrogans sorovar Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130, sendo este o controle. Em outro poço da placa, seguindo uma coluna, se fez a adição de soro hiperimune diluído 1:25, sendo 10 µL de soro hiperimune para 240 µL de PBS 1X, e antígeno (*Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130), sendo este o título. No próximo poço, da mesma coluna, se fez a adição de soro hiperimune 1:25, PBS 1x e antígeno. Posteriormente, foi se realizando a diluição seriada da amostra, sendo a titulação de 1:50 a 1:6400.

A placa foi incubada por 2 h 30 min em estufa BOD a 30 °C. Após este período, foi realizada a leitura da placa utilizando microscópio de campo escuro. O teste foi considerado reagente quando houve aglutinação de 50% ou mais Leptospiras em relação ao controle.

4.3.3 Preparação do Cultivo de Baixa Passagem (9:6) para Utilização em Testes Imunodiagnósticos

A *Leptospira interrogans sorovar Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130 com baixa passagem *in vitro* (passagem 9:6, sendo 9 o número de passagens *In vivo* e 6 *In vitro*) foi cultivada em meio EMJH acrescido de 10% de suplemento comercial DIFCO por sete dias, após este período foi realizada a contagem de Leptospiras em câmara de *Petroff-Hausser Counting Chamber*.

O cultivo foi diluído 7 vezes, até que se chegasse a contagem de 10^1 (10) Leptospiras por ml. Para a diluição da cultura foram utilizados 8 tubos do tipo *Falcon* de 15 ml, contendo 9 ml de PBS em cada tubo. No primeiro tubo adicionou-se 1 ml da cultura, após este procedimento realizou-se a diluição seriada da cultura, contendo, como volume final, 10 ml de cultura diluída. Cada diluição foi aliqüotada em 1 ml em microtubos de centrífuga. As culturas foram centrifugadas por 10 min a 13000 rpm e lavadas com PBS, sendo este processo repetido por duas vezes. Posteriormente a última centrifugação, os microtubos foram colocados em banho-maria a 56 °C durante

25 min para a inativação das bactérias, posteriormente, o *pellet* foi armazenado a -20 °C.

4.3.4 SDS-PAGE para Visualização dos Cultivos de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130

Três amostras, sendo elas o marcador de peso molecular (Amersham ECL), antígeno bruto de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (passagem 9:6) na contagem 10^8 e 10^3 foram preparados, conforme processo citado anteriormente, e separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 12%. Após a eletroforese, o gel foi corado com *Comassie Blue overnight* e descorado com Solução Descorante.

4.3.5 SDS-PAGE e *Western Blotting* para Avaliação do Reconhecimento da IgY anti-rLigBrep contra Cultivo de *Leptospira interrogans* de Baixa Passagem (9:6)

Cinco amostras, sendo elas marcadores de peso molecular (Amersham ECL) e os antígenos brutos de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 na contagem de 100000000 (10^8), foram separadas eletroforéticamente, como processo já citado anteriormente, e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, conforme processo citado anteriormente. Após a transferência das amostras, foi adicionada a solução de bloqueio 5% à membrana, *overnight*. Após este procedimento, a membrana foi lavada 3 vezes consecutivas com PBS-T e se fez a separação da membrana em três tiras. Posteriormente, se fez a adição dos anticorpos primários, respectivamente, soro hiperimune - título 1:50 (titulado anteriormente por MAT), IgY Semana 3 anti-rLigBrep na diluição 1:50 e na proporção 1:50 e a terceira adicionou-se soro convalescente anti-LigBrep (diluição 1:100) de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 obtido de hamster (*Mesocricetus auratus*), sendo todos os anticorpos diluídos previamente em PBS. Após 1 h a temperatura ambiente e sob agitação em *shaker* horizontal, as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T, após isso se fez a adição do anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase, sendo o anticorpo anti-hamster

(diluição 1:8000) para a primeira e terceira tiras e o anticorpo anti-*chicken* (diluição 1:4000) adicionado a segunda tira. Após 1 h a temperatura ambiente e sob agitação, as membranas foram lavadas por 5 vezes consecutivas e a revelação foi realizada utilizando DAB, conforme processo citado anteriormente.

4.3.6 ELISA para Desenvolvimento de um Ensaio para a Detecção da Leptospirose

Para avaliação do reconhecimento da IgY S3 anti-rLigBrep (1:50) contra cultivo de *Leptospira interrogans sorovar Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130 de baixa passagem (9:6), uma placa de 96 poços foi sensibilizada *overnight* com 100 µL de diferentes concentrações de Leptospiras, em replicata, sendo elas 10^8 , 10^3 e 10^1 Leptospiras por ml. Anteriormente a realização da técnica os cultivos foram centrifugados por 10 min a 13000 rpm, onde os sobrenadantes foram descartados e cada *pellet* ressuspenso em 100 µL de tampão de sensibilização (carbonato-bicarbonato pH 9,6).

Como controles positivos, se fez a sensibilização *overnight* da placa com 10^8 Leptospiras (9:6). Além disso, se fez a sensibilização com soro hiperimune (1:50), soro convalescente (1:100) e soro coletado da ave no dia 28 anteriormente a imunização (1:100), todos em duplicata e citados em procedimentos anteriores.

Como controle negativo se fez a sensibilização *overnight* com 10^8 Leptospiras (9:6).

Após a placa estar sensibilizando *overnight*, se fez a lavagem da placa por 3 vezes consecutivas com PBS-T e adicionou-se os anticorpos primários, sendo IgY S3 anti-rLigBrep nos poços que continham, em replicata, as amostras 10^8 , 10^3 e 10^1 , soro hiperimune, soro convalescente e soro coletado da ave no dia 28. Nos controles positivos sensibilizados com 10^8 , foi adicionado o soro hiperimune (1:50) e soro convalescente (1:100), respectivamente, ambos citados em procedimentos anteriores, e no controle negativo se fez a adição de PBS. Após a incubação da placa por 1 h em estufa BOD a 37 °C, foi realizada uma nova lavagem da placa e a adição dos anticorpos secundários conjugados a enzima peroxidase, os anticorpos anti-*chicken* (1:4000) foram adicionados aos poços contendo IgY S3 e nos poços restantes se fez a adição de anti-hamster (1:8000). A placa foi incubada por 1 h a 37 °C e

posteriormente lavada 5 vezes com PBS-T. O protocolo de revelação seguiu o procedimento citado anteriormente, bem como a leitura da placa.

4.4 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Microsoft Office Excel 2013.

5 Resultados

5.1 Avaliação da Produção e Extração da IgY anti-rLigBrep

5.1.1 Avaliação do ELISA Indireto para a Produção de Soros Policlonais Utilizando Soro da Galinha Imunizada

O ELISA indireto realizado com o sangue coletado previamente às imunizações, com a finalidade de avaliar a produção de anticorpos na ave, demonstrou que houve produção de anticorpos contra a proteína recombinante logo após a primeira dose. Estes anticorpos, por sua vez, estão presentes no sangue do animal e são transferidos para a gema do ovo, de onde podem ser extraídos.

5.1.2 Curva de BCA para Quantificação e Especificidade da IgY anti-rLigBrep

A curva de BCA demonstrou com o valor de R^2 que os resultados encontrados na curva de BCA encontram-se correlacionados entre si (Figura 1).

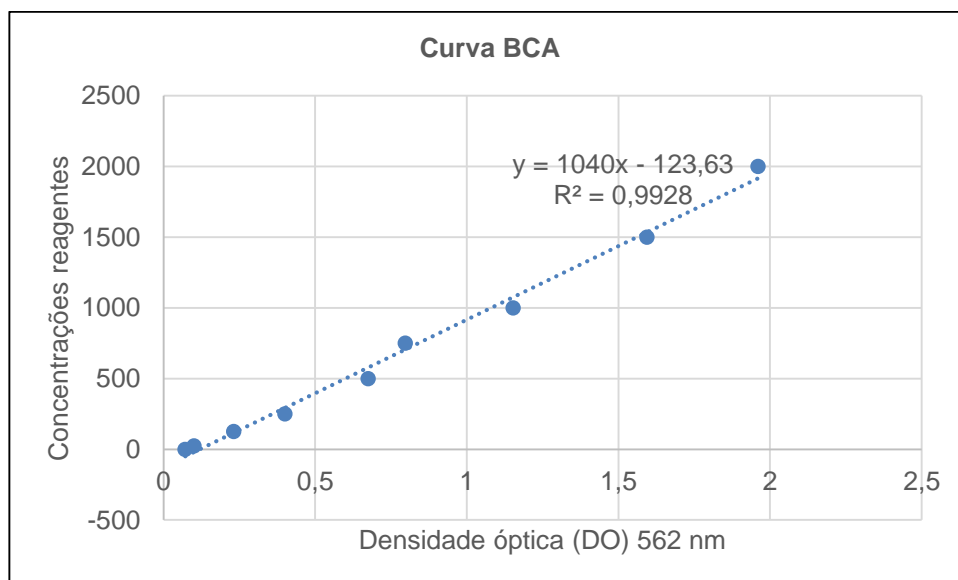


Figura 1 – Regressão linear para a curva de BCA.

5.1.3 Quantificação das IgY anti-rLigBrep

A quantificação das Imunoglobulinas Y demonstrou elevada concentração quando analisada por espectrofotômetro a 562 nm. No entanto, a concentração apresentou ser decrescente no decorrer das 10 semanas estudadas, mas os valores encontrados não se aproximaram de 0 em nenhuma das semanas (Figura 2).

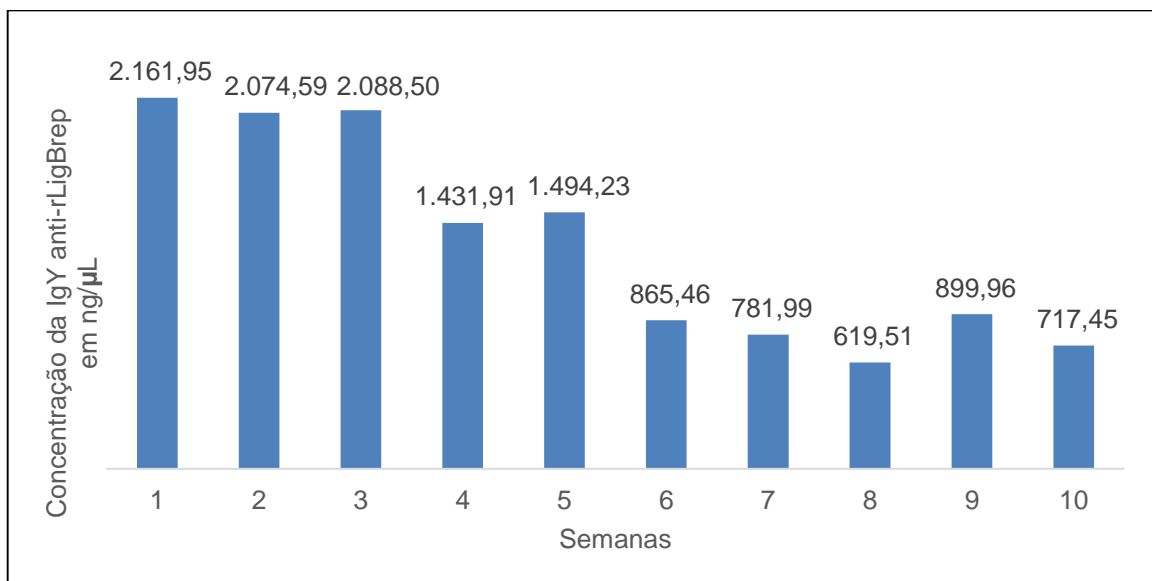


Figura 2 – Gráfico de barras – Quantificação da IgY anti-rLigBrep. Semana 1 (S1), 2. S3, 3. S3, 4. S4, 5. S5, 6. S6, 7. S7, 8. S8, 9. S9, 10. S10.

5.1.4 SDS-PAGE para a Visualização da Extração da IgY anti-rLigBrep Policlonal da Gema dos Ovos da Galinha Imunizada

A extração da IgY total na diluição das gemas dos ovos da galinha imunizada, foi confirmada por gel de SDS-PAGE (Figura 3), apresentando o tamanho esperado para IgY (cadeias leves – 18 a 25 kDa e cadeias pesadas – 65 a 68 kDa).

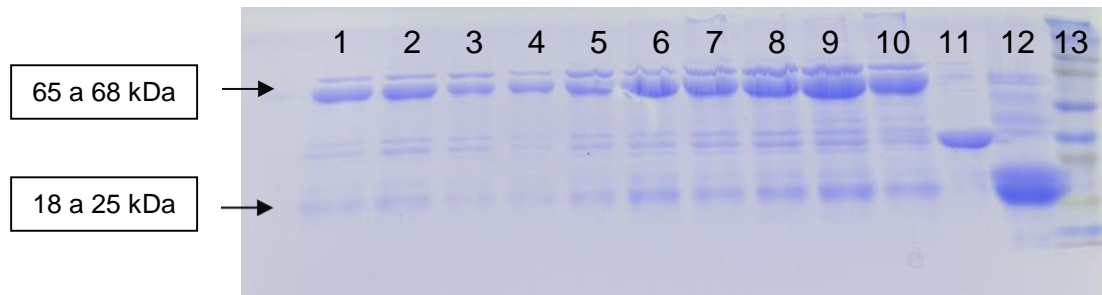


Figura 3 – SDS-PAGE para avaliação da extração da IgY 1:100 das gemas dos ovos. 1. IgY 1:100 Semana 10 (S10), 2. S9, 3. S8, 4. S7, 5. S6, 6. S5, 7. S4, 8. S3, 9. S2, 10. S1, 11. rLigB 7-11, 12. IgY anti-LipL32, 13. Marcador de peso molecular pré corado (Amersham ECL).

5.1.5 SDS-PAGE e *Western Blotting* para Caracterização da IgY anti-rLigBrep

As amostras selecionadas para a realização do *Western Blotting* foram visualizadas anteriormente em gel de SDS-PAGE. As amostras IgY S3 anti-rLigBrep 1:100 e 1:50 (cadeia leve 25 kDa/ cadeia pesada 65-68 kDa), proteína nativa LigBrep (54 kDa), proteína recombinante LigBni (66 kDa) e proteína recombinante LIC 11207 (34 kDa), demonstraram o peso molecular esperado para as proteínas (Figura 4).

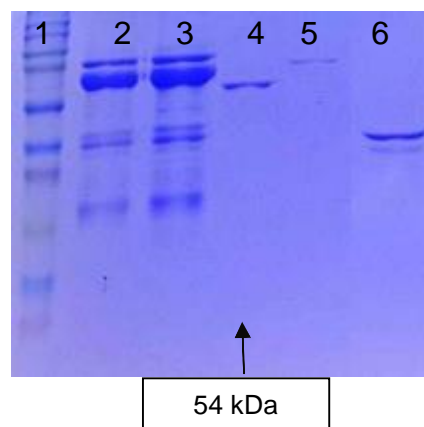


Figura 4 – SDS –PAGE para a visualização das amostras utilizadas para a realização da técnica de *Western Blotting*. 1. Marcador de peso molecular (Amersham ECL), 2. IgY S3 anti-rLigBrep 1:100, 3. IgY S3 1:50, 4. Proteína nativa LigBrep 1:100, 5. Proteína recombinante LigBni 1:50, 6. Proteína recombinante LIC 11207.

O *Western Blotting* demonstrou que a IgY S3 anti-rLigBrep reconhece fortemente a proteína nativa LigBrep e a IgY anti-rLigBrep na diluição 1:100 e 1:50, nos tamanhos esperados. Como esperado, o anticorpo obtido não reconhece a proteína recombinante LigBni e a proteína recombinante LIC 11207 (Figura 5).

Demonstrado a especificidade da IgY S3 contra a proteína LigBrep de *Leptospira interrogans*.

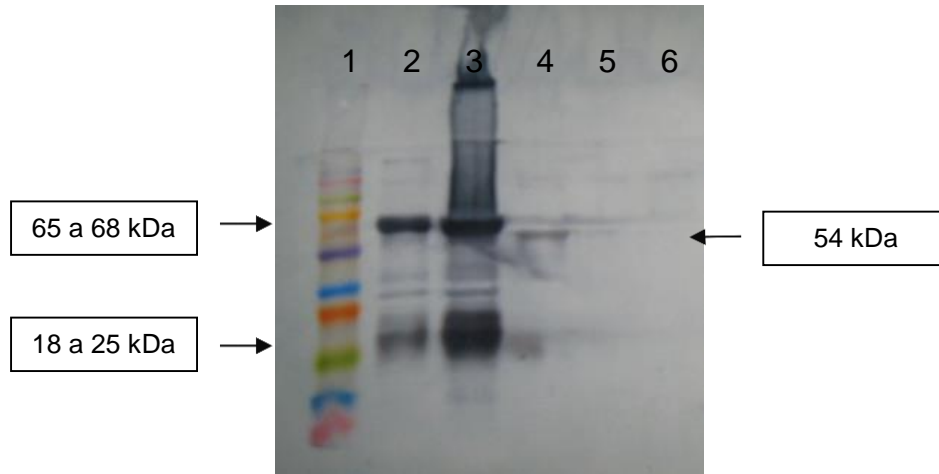


Figura 5 – *Western Blotting* para a caracterização da IgY anti-rLigBrep. 1. Marcador pré-corado (Amersham ECL), 2. IgY S3 anti-rLigBrep 1:100, 3. IgY S3 anti-rLigBrep 1:50, 4. LigBrep nativa, 5. rLigBni, 6. LIC 11207.

5.1.6 ELISA Indireto para a Caracterização da IgY S3 anti-rLigBrep

O ELISA para a caracterização da IgY S3 anti-rLigBrep demonstrou que o anticorpo produzido e extraído reconhece a proteína LigBrep nativa quando utilizada em diferentes concentrações. Pode ser observado que com 100 ng e 200 ng de proteína a IgY anti-rLigBrep produzida reconheceu a proteína nativa, mesmo quando este anticorpo foi utilizado em altas diluições (1:25600), sendo assim nenhum dos resultados encontra-se abaixo do limiar (0,024). O anticorpo produzido reconheceu a proteína LigBrep (50 ng) até a diluição 1:12800, demonstrando um forte reconhecimento, mesmo quando a proteína se encontra em baixas concentrações (Figura 6).

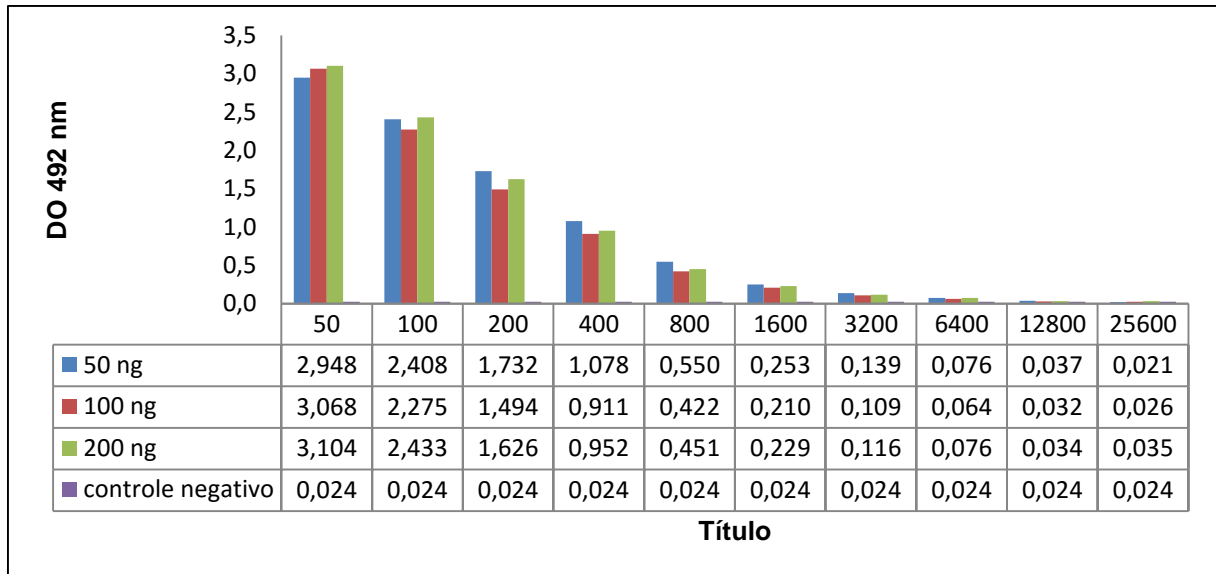


Figura 6 – Gráfico de Barras - Caracterização da IgY S3 anti-rLigBrep. Caracterização da IgY S3 anti-rLigBrep. 50 ng, 100 ng e 200 ng correspondem a concentração da LigBrep utilizada para a sensibilização da placa de 96 poços, controle negativo corresponde a sensibilização da placa com 100 ng de LigBrep, PBS 1X substituindo o anticorpo primário e anti-*chicken* como anticorpo secundário.

5.2 Avaliação de um Ensaio para Detecção da Leptospirose na Fase Aguda

5.2.1 MAT – Titulação do Soro Hiperimune

O MAT para avaliação da titulação do soro hiperimune, demonstrou que o título para utilização do soro é de 1:50.

5.2.2 SDS-PAGE para Visualização dos Cultivos de *Leptospira interrogans*

Os cultivos de baixa passagem (9:6), preparados para utilização no teste imunodiagnóstico, foram anteriormente visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. As amostras 10^8 e 10^3 apresentaram o peso molecular esperado de 100 kDa. (Figura 7).

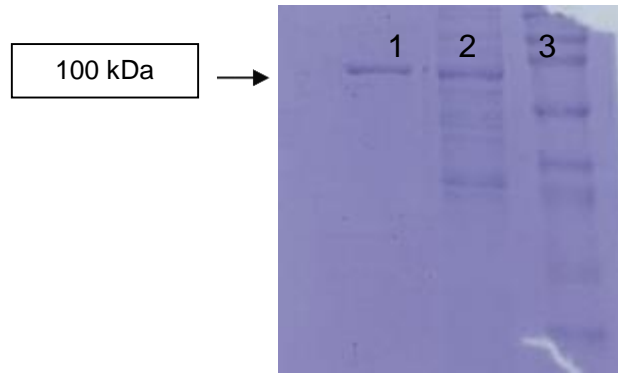


Figura 7 – SDS –PAGE para avaliação dos cultivos de baixa passagem produzidos. 1. Antígeno bruto 10^3 , 2. Antígeno bruto 10^8 , 3. Marcador de peso molecular (Amersham ECL).

5.2.3 *Western Blotting* para Avaliação da IgY S3 anti-rLigBrep Quanto ao Reconhecimento do Cultivo de Baixa Passagem de *Leptospira interrogans*

O soro hiperimune demonstrou reconhecer o cultivo de 10^8 Leptospiras por ml (Figura 8-a). A IgY S3 anti-rLigBrep produzida e extraída, demonstrou reconhecer a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, inativada e de baixa passagem (9:6) na contagem 10^8 (Figura 8-b). O soro convalescente também demonstrou reconhecer o cultivo de 10^8 Leptospiras por ml (Figura 8-c).

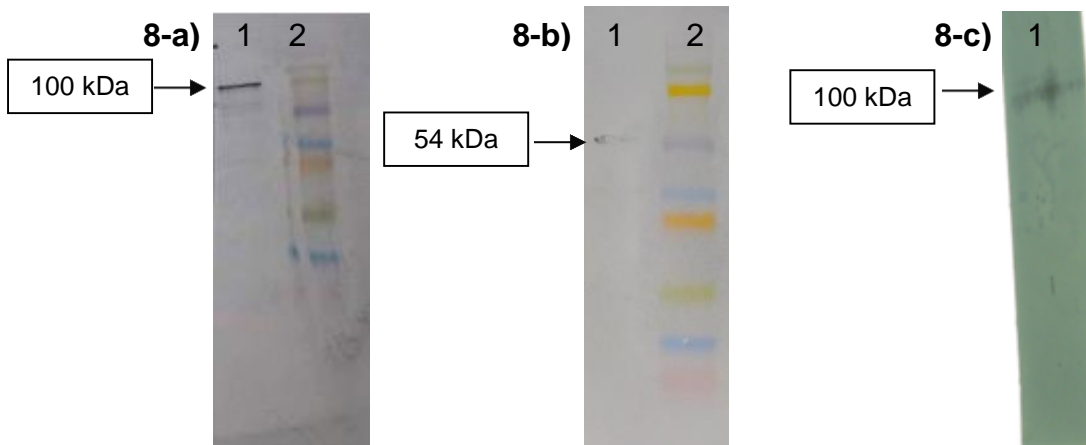


Figura 8-a – *Western Blotting* para avaliação quanto ao reconhecimento do soro hiperimune ao cultivo de *Leptospira interrogans* de baixa passagem. 1. 10^8 (testado com soro hiperimune), 2. Marcador de peso molecular (Amersham ECL).

Figura 8-b – *Western Blotting* para avaliação quanto ao reconhecimento da IgY anti-rLigBrep ao cultivo de *Leptospira interrogans* de baixa passagem. 1. 10^8 (testado com IgY anti-rLigBrep), 2. Marcador de peso molecular (Amersham ECL).

Figura 8-c – *Western Blotting* para avaliação quanto ao reconhecimento do soro convalescente ao cultivo de *Leptospira interrogans* de baixa passagem. 1. 10^8 (testado com soro convalescente).

5.2.4 ELISA Indireto

O resultado do ELISA demonstrou que o anticorpo IgY S3 anti-rLigBrep reconheceu o cultivo *in vitro* de baixa passagem de *L. interrogans* nas três concentrações testadas (10^8 , 10^3 e 10^1) (Figura 12). O grande desvio padrão encontrado para o cultivo 10^8 (desvio padrão 0,128693), é esperado, uma vez que se tem uma alta concentração de Leptospiras por ml da amostra. Os desvios padrão encontrados para as concentrações 10^3 e 10^1 (desvio padrão 0,014849 e 0,002828, respectivamente) são menores e demonstram que os resultados encontram-se correlacionados nas replicatas utilizadas (Figura 9).

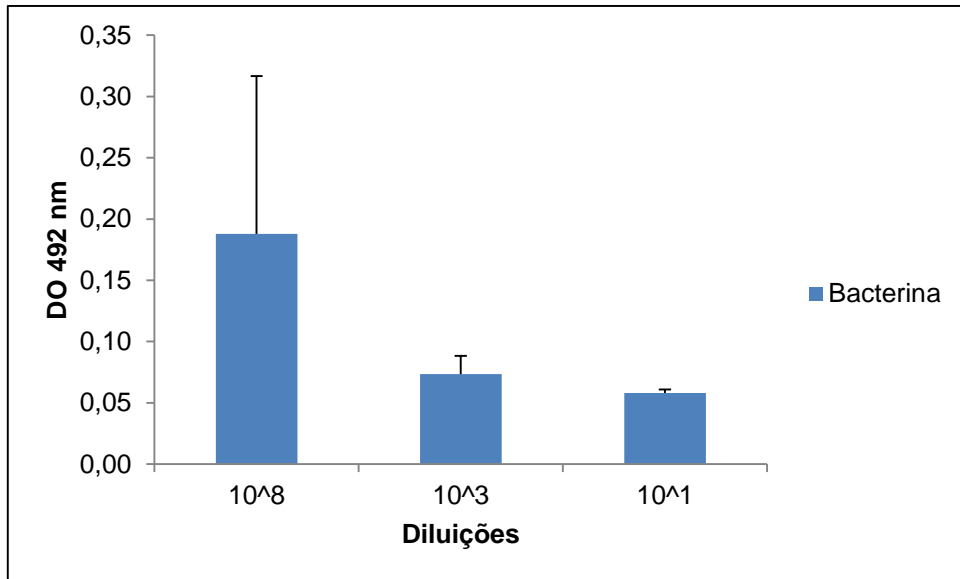


Figura 9 – Gráfico de Barras – Avaliação do ELISA para Desenvolvimento de um Ensaio para a Detecção da Leptospirose.

6 Discussão

O uso de galinhas tem sido uma alternativa a produção de anticorpos policlonais (SHADE *et al.*, 2005). A imunoglobulina Y é o principal anticorpo produzido por aves e se mostra equivalente a IgG de mamíferos (sendo considerada um ancestral evolutivo de IgG, IgE e IgA de mamíferos), tanto no seu processo funcional quanto na transferência dos anticorpos, presentes no soro, para a gema dos ovos que se assemelha a transferência placentar ou colostrar que ocorre em mamíferos (ZHANG, 2003).

GASSMANN e colaboradores (1990), demonstraram através da imunização de aves que é possível a obtenção de altos títulos de anticorpos IgY, estáveis por várias semanas. HLINAK e colaboradores (1996), produziram anticorpos IgY contra antígenos associados a células humanas e demonstraram que a produção de anticorpos específicos se manteve estável por até 16 semanas após a imunização inicial. TU e colaboradores (2001) realizaram o isolamento de IgY da gema dos ovos e de IgG no soro de coelhos, ambos imunizados com lactoferrina bovina e demonstraram que o título de anticorpos IgY permanece constante nas gemas dos ovos das aves por até 16 semanas após a imunização inicial, enquanto a IgG extraída do soro de coelhos apresenta decréscimo com 13 semanas após a imunização inicial. TAVARES e colaboradores (2013) imunizaram galinhas da raça *White Leghorn* com uma suspensão de *Leptospira interrogans* inativada e com proteínas de membrana externa de *Leptospira sorovar* Hardjo e obtiveram a produção de IgY específica para esses antígenos estáveis por várias semanas, sendo o pico da titulação na quinta semana após a imunização inicial, além disso demonstraram que é possível obter anticorpos específicos contra o antígeno utilizado na imunização através da tecnologia da IgY.

Os dados obtidos no presente estudo confirmam que é possível produzir e obter a IgY anti-rLigBrep através da imunização de galinhas. Os títulos de IgY podem permanecer elevados e específicos contra a LigBrep por várias semanas, não apresentando resultados próximos a 0 por até 10 semanas e além disso este anticorpo reconhece a proteína LigBrep nativa quando diluído de 50 a 25600 vezes, conforme apresentado neste trabalho, condizendo com o que se encontrou em estudos anteriores.

VASCONCELLOS e colaboradores (2010) produziram IgY contra células inativadas de *L. interrogans sorovar Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130, *L. biflexa sorovar patoc 1* e anticorpos monoclonais contra proteínas específicas da *Leptospira* e testaram em três formatos de ELISA de captura de antígeno, demonstrando que a IgY foi capaz de reconhecer concentrações entre 10^5 e 10^6 Leptospiras por ml em soros de humanos experimentalmente contaminados quando utilizada na forma biotinizada e em conjunto com os anticorpos monoclonais. No presente estudo é demonstrado que a IgY anti-rLigBrep foi capaz de reconhecer até 10^1 Leptospiras por ml utilizando cultivos de baixa passagem de Leptospiras obtidas de soros de animais experimentalmente contaminados, quando testados por ELISA indireto. Desta forma, os resultados deste trabalho demonstram um avanço em relação aos limites de detecção da IgY contra a *Leptospira*. Além disso, no presente estudo foi realizada de forma inédita a produção de IgY anti-rLigBrep de *L. interrogans sorovar Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130.

A IgY já tem sido amplamente utilizada como imunoterapia em animais e humanos (KOVACS-NOLAN *et al.*, 2012), bem como em imunohistoquímica detectando vírus, bactérias e parasitos. O Instituto Butantan apoiado pelo grupo Pró-África, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense tem produzido IgY contra toxinas presentes em venenos de serpentes, fazendo a neutralização destas substâncias no organismo de pessoas ou animais (DA ROCHA, 2010). KRISHNAN e colaboradores (2015) concluíram que a IgY produzida numa forma quase pura é segura e eficiente para o tratamento de picadas de cobra. A aplicação de IgY como imunoterapia, protegendo camundongos e bezerros recém-nascidos de diarreia causada por rotavírus com a administração oral de IgY, apresentando efeitos moduladores sistêmicos e em mucosas, já foi demonstrada (KUROKI *et al.*, 1993; SARKER *et al.*, 2007; VEGA *et al.*, 2011; VEGA *et al.*, 2015). JÚNIOR (2012) demonstrou que é possível a utilização de IgY como ferramenta no diagnóstico de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), através de seu uso em técnicas imunológicas como *Western blotting* e imunohistoquímica.

RESCHOVÁ e colaboradores (2000) demonstraram a aplicação de IgY contra rotavírus bovino utilizando a técnica de imunocromatografia. POKOROVÁ e colaboradores (2000), demonstraram que a IgY pode ser utilizada como diagnóstico para parvovirose canina quando associada ao ELISA. Além disso, já foi relatada a

proteção passiva de cães contra a doença clínica devido ao Parvovírus canino tipo 2 utilizando IgY (NGUYEN *et al.*, 2006). VASCONCELLOS e colaboradores (2010) demonstraram a utilização de IgY em ELISA. No presente estudo, foi demonstrado que é possível a utilização de IgY em ELISA como método diagnóstico para leptospirose, condizendo assim, com os relatos da literatura e apresentando uma nova forma de diagnóstico para animais e humanos suspeitos de leptospirose.

SANTOS e colaboradores (2014) recomendam o uso de IgY para diagnósticos de doenças caninas, avaliando a tecnologia da IgY como uma excelente alternativa para a produção de anticorpos em larga escala, além de ser um método simples e não invasivo.

No presente estudo, demonstrou-se que a produção de IgY contra leptospiras inteiras bem como contra proteínas recombinantes constitui-se em uma alternativa ética, de baixo custo e com uma boa quantidade de anticorpos obtidos, quando comparada a produção de anticorpos em mamíferos e o teste sorológico desenvolvido, apresenta-se como potencial método de diagnóstico para a detecção de leptospiras, no entanto mais estudos são necessários para a comprovação deste método.

7 Conclusão

Anticorpos IgY anti-rLigBrep produzidos, reconhecem a proteína LigB nativa em leptospiros virulentos.

Os anticorpos produzidos, quando utilizados em um ELISA indireto, possuem a capacidade de detectar leptospiros vivos em amostras experimentalmente contaminadas com a concentração de 10 leptospiros por ml.

Referências

ADLER, B.; MOCTEZEUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Aglutininas antileptospíricas em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAR, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

CALZADO, G. E.; GARCÍA, G. R. M.; SCHADE, R. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood antigens. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 29, n. 6, p. 717-726, 2001.

CARLANDER, D.; WILHELMSON, M.; LARSSON, A. Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. **Food and Agricultural Immunology**, v. 15, n. 1, p. 35-40, 2002.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J. A.; PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 9, p. 1173-1181, 2009.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F.; Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 189-193, 2004.

DA ROCHA, D. G. **Isolamento transcriptômico das sequências variáveis de IgY de galinhas poedeiras (*Gallus gallus*) antivenenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus***. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2010.

DA SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 173-180, 2010.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FÉLIX, S. R.; DA SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. A. Recombinant vaccine against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v.7, n. 11, p.1215-1224, 2011.

DUNGU, B.; BRETT, B.; MACDONALD, R.; DEVILLE, S.; DUPUIS, L.; THERON, J.; BRAGG, R. R. Study on the efficacy and safety of different antigens and oil formulations of infectious coryza vaccines containing an NAD-independent strain *Avibacterium paragallinarum*. **Journal of Veterinary Research**, v. 76, p. 299-309, 2009.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 99-137, 2015.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2 ed. Austrália: MedSci, 1999, 272 p.

FIGUEIRA, C. P. **Caracterização de mutantes de *Leptospira* spp. na identificação de fatores de virulência**. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

FIGUEIRA, C. P.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells fibronectin. **Biomed Central Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 129, 2011.

GASSMANN, M.; THÖMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, p. 2528-2532, 1990.

GOARANT, C.; BOURHY, P.; D'ORTENZIO, E.; DARTEVELLE, S.; MAURON, C.; SOUPÉ-GILBERT, E.; BRUYERE-OSTELLS, L.; GOURINAT, A-C.; PICARDEAU, M.; NATO, F.; CHANTEAU, S. Sensitivity and specificity of a new vertical flow rapid diagnostic test for the serodiagnosis of human leptospirosis. **Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 6, p. 1-9, 2013.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Leptospira* spp.** Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B. Genetic-environmental interactions and antibody response in chickens to two antigens. **Avian Diseases**, v. 34, p. 843-847, 1990.

GUIMARÃES, M. C. C. **Produção e aplicação de anticorpos da gema do ovo de galinha.** Tese (Doutorado em Produção Animal com Ênfase em Imunogenética) – Centro de Ciências em Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2005.

HARTSKEERL, R. A.; PEREIRA-COLLARES, M.; ELLISA, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HLINAK, A.; SCHRODL, W.; WITT, S.; SCHADE, R.; KRUGER, M. Production of egg yolk antibodies against human cell – associated antigens. **Alternativ zu Tierexperimenten**, v.13, n. 5, p. 76-79, 1996.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 31-32, p. 5787-5799, 2006.

HUMPHRYES, P. C.; WEEKS, M. E.; ABUOUN, M.; THOMSON, G.; NÚÑES, A.; COLDHAM, N. G. Vaccination with Leptospiral outer membrane lipoprotein LipL32 reduces kidney invasion of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in hamsters. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 4, p. 546-551, 2014.

JANSEN, T.; HOFMANS, M. P. M.; THEELEN, M. J. G.; MANDERS, F.; SCHIJNS, V. E. J. C. Structure – and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. **Vaccine**, v. 24, n. 26, p. 5400-5405, 2006.

JÚNIOR, A. F. **Anticorpos IgY policlonais: Ferramentas auxiliares para o estudo in vitro de *Toxoplasma gondii*.** Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicada) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 3, p. 341-348, 2004.

KLEMPERER, F. Ueber naturliche Immunitat und ihre Verwerthung fur die Immunisirungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 31, n. 4, p. 356-382, 1893.

KLIPPER, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Response, tolerance and ignorance following oral exposure to a single dietary protein antigen in *Gallus domesticus*. **Vaccine**, v. 19, n. 20-22, p. 2890-2897, 2001.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 163-182, 2012.

KRISHNAN, L. K.; SAROJA, J. B.; RAJALINGMAN, M.; JOHN, V.; VALAPPIL, M. P.; SREELATHA, H. V. Rabbit snake-bite model to assess safety and efficacy of anti viper chicken antibodies. **American Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 32-38, 2015.

KUROKI, M.; IKEMORI, Y.; YOKOYAMA, H.; PERALTA, R. C.; ICATLO, F. C. J.; KODAMA, Y. Passive protection against bovine rotavirus- induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 1-2, p. 135-146, 1993.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v. 10, n. 1, p. 29-36, 1998.

LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJOQUIST, J. Use of chicken antibodies in chicken enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 411-414, 1991.

LARSSON, A.; WEJAKER, P. E.; FORSBERG, P. O.; LINDAHL, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 156, n. 1, p. 79-83, 1992.

LEENARS, P. P.; HENDRIKSEN, C. F.; DE LEEUW, W. A.; CARAT, F.; DELAHAUT, P.; FISCHER, R.; HALDER, M.; HANLY, M. C.; HARTINGER, J.; HAU, J.; LINDBLAD, E. B.; NICKLAS, W.; OUTSCHOORN, I. M.; STEWART-TULL, D. E. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. **Alternative to Laboratory Animals**, v. 27, n. 1, p. 79-102, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LIN, Y-P.; CHANG, Y-F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2, p. 443-448, 2007.

LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258-268, 2005.

MARCQ, C.; MARLIER, D.; BECKERS, Y. Improving adjuvant systems for polyclonal egg yolk antibody (IgY) production in laying hens in terms of productivity and animal welfare. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 165, n. 1-2, p. 54-63, 2015.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-45, 2003.

MCBRIDE, A. J.; ALTHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

MOHAMMED, S. M.; MORRISON, S.; WIMS, L.; TRINH, K. R.; WILDEMAN, A. G.; BONSELAAR, J.; ETCHES, R. J. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, v. 4, n. 2, p. 115-125, 1998.

MONTE, L. G. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a região idêntica das proteínas LigA e LigB de *Leptospira interrogans*.**

Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

MORRISON, S. L.; MOHAMMED, M. S.; WIMS, L. A.; TRINH, R.; ETCHESS, R.

Sequences in antibody molecules importante for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 8, p. 619-625, 2002.

MUNHOZ, L. S.; VARGAS, G. D.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P. A.;

HBNER, S. O. Avian IgT antibodies: Characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 153-169, 2014.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; MARTINS, E. A. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, L. C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOÉS-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. F. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; SLUYS, M. A. V. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals nove insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004.

NGUYEN, S. V.; UMEDA, K.; YOKOYAMA, H.; TOHYA, Y.; KODAMA, Y. Passive

protection of dogs against clinical disease due to canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 1, p. 62-64, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Métodos laboratoriais para diagnóstico de leptospirose.** Ministério da Saúde, Brasília, 2013. Online. Disponível em:

<<http://saude.to.gov.br/index.php/publicacoesdownloads/category/104leptospirose%3Fdownload%3D1011:metodos-laboratoriais-paradiagnostico+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>. Acesso em: 23 de setembro de 2015.

PAULY, D.; CHACANA, P. A.; CALZADO, G. E.; BREMBS, B.; SCHADE, R. IgY

technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, v. 51, p. 1-6, 2011.

PHRAISUWAN, P.; WHITNEY, E. A.; THARMAPHORNIPILAS, P.; GUHARAT, S.; THONGKAMSAMUT, S.; ARESAGIG, S.; LIANGPHONGPHANTHU, J.; JUNTHIMA, K.; SOKAMPANG, A.; ASHFORD, D. A. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1455-1459, 2002.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULOUDIS, A. N.; DURSKEI, K.; HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic, Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2014.

POKOROVÁ, D.; FRANZ, J.; STEPÁNEK, J. The use of egg yolk immunoglobulin in the diagnostics of canine parvovirus infections. **Veterinary Medicine**, v. 45, n. 2, p. 49-54, 2000.

RESCHOVÁ, S.; FRANZ, J.; STEPÁNEK, J.; ROZKOSNÁ, A. Imunochromatografická detekce bovinního rotaviru s využitím protilátek vaječného zloutku. **Veterinary Medicine**, v. 45, n. 2, p. 33-37, 2000.

SANTOS, F. N.; BRUM, B. C.; CRUZ, P. B.; MOLINARO, C. M.; SILVA, V. L.; CHAVES, S. A. M. Production and Characterization of IgY against canine IgG: Prospect of a new tool for the immunodiagnostic of canine diseases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n. 4, p. 523-531, 2014.

SARKER, S. A.; PANT, N.; JUNEJA, L. R.; HAMMARSTROM, L. Successful treatment of rotavirus- induced diarrhoea in suckling mice with egg yolk immunoglobulin. **Journal Health Population and Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 465-468, 2007.

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**, v. 33, n. 2, p. 129-54, 2005.

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; REGENMORTEL, M. V.; RIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 24, p. 925-934, 1996.

- SCHADE, R.; TERZOLO, H. R. IgY technology: application and trends. p. 1-9, 2012.
- TAVARES, T. C. F.; SOARES, P. M.; NEVES, J. H. F. F.; SOARES, M. M.; JUNIOR, F. A.; DE SOUZA, D. L. N.; ÁVILA, V. M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-*Leptospira* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1097-1102, 2013.
- TU, Y. Y.; CHEN, C. C.; CHANG, H. M. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. **Food Research International**, v. 34, n. 9, p. 783-789, 2001.
- WOOLLEY, J. A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, n. 2, p. 253-265, 1995.
- VASCONCELLOS, F. A.; COUTINHO, M. L.; DA SILVA, E. F.; FERNANDES, C. P. H.; MONTE, L. G.; SEYFFERT, N.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Testing diferente antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 4, p. 259-264, 2010.
- VASCONCELOS, Y. Anticorpos de Valor. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 170, p. 68-73, 2010.
- VEGA, C.; BOK, M.; CHACANA, P.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F.; PARREÑO, V. Egg yolk IgY: Protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 3-4, p. 156-169, 2011.
- VEGA, C.; BOK, M.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F.; PARREÑO, V. Egg yolk antibodies: a therapeutic intervention against group a rotavirus in calves. **Research in Veterinary Science**, v. 103, p. 1-10, 2015 (No prelo).
- ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 8, p. 364-371, 2003.