

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgY
PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

Pollyanna Mafra Soares
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS –BRASIL
Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgY
PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

Pollyanna Mafra Soares

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde
Animal)

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS –BRASIL
Fevereiro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S676p Soares, Pollyanna Mafra, 1984-
2013 Produção e utilização de anticorpos *igy* para diagnóstico de bruce-
lose / Pollyanna Mafra Soares. -- 2013.
119 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Imunoglobulinas - Teses. 3. Brucelose
- Diagnóstico - Teses. 4. Galinha - Teses. I. Ribeiro, Anna Monteiro
Correia Lima. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos, namorado, amigos, e a minha orientadora, que, com todo apoio e carinho, me fizeram encarar esta etapa de forma mais paciente, com uma simples palavra de afeto, de otimismo, pra que nada me fizesse desanimar ou perder a vontade de seguir em frente e concluir mais esta tarefa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a vida e enchê-la de força e coragem para prosseguir com a caminhada.

Aos meus pais, que são a base do que sou hoje, que não mediram esforços para que eu tivesse uma boa educação, por sempre me apoiarem em cada escolha que faço, e nos quais me espelho pelo exemplo de honestidade.

Aos meus irmãos, Ró e Yayá, e à minha cunhada Natassia, uma irmã pra mim, que com todo seu carinho, sempre estiveram ao meu lado me apoiando.

Ao meu namorado, que, pelo pouco tempo que estamos juntos, tem me ajudado muito com a sua compreensão e carinho, sempre estando ao meu lado pra me tranquilizar e me dar apoio.

A todos os amigos que amo de paixão: Karlinha e Kellinha (irmãzonnas), companheiras pra todos os momentos; Jú, Beletim, Carol, Lirinha, Etzinho, Véio, Mel, Vanessinha, Jôjô, Fred, Dedé, Fer, Andressa, William, Zézim, Fefs, Darci, Elisângela, que enchem a minha vida de felicidade. Adoro vocês!!!

À professora Anna, pela amizade, pelos conselhos, pela paciência, pela tranquilidade e pelo incentivo que nos dá mesmo em situações preocupantes em que achamos que não será possível concluí-las. A quem admiro por sua dedicação, perseverança e por representar grupos tão unidos, seja no PET, seja em nosso grupo de pesquisa LADOC.

Aos meus colegas e veteranos de LADOC, João Helder e Tatiane, que com o tempo se tornaram grandes amigos, com cuja ajuda sempre pude contar em qualquer situação que fosse, seja pelo lado profissional, seja pelo lado pessoal. Agradeço também pelo companheirismo, pela paciência e pela colaboração durante o todo tempo em que trabalhamos juntos, e pelos ótimos momentos de descontração que vivemos, que, tenho certeza, ficarão guardados em meus pensamentos sempre como boas lembranças.

Às colegas “bixetes” de LADOC: Dayane, Mariana, Mariane, Muriel e Gabriela, que também se tornaram grandes amigas, que são sinônimos de companheirismo e apoio mútuo. Que me deixarão cheia de recordações, pelos momentos de risadas, pelos “happy hours”, surpresas de aniversários, pela festinha do abandono (não é Mariane?), jantarzinhos na Muri, por tudo que já aprontamos juntas.

Meu agradecimento especial vai às “mestretes” Mariana, Mariane e Muriell; aos meus pais, Mafra e Joaquim, e à minha irmã Yayá, que muito me ajudaram com as minhas galinhas do experimento em períodos em que não estava em Uberlândia, tratando-as muito bem, e, o mais importante, seguindo à risca a lista de recomendações deixada...rsrsrsrs

À colega e doutoranda Nádia, pelos ensinamentos de vida e de profissão. Uma pessoa a qual admiro pela coragem, pela força e por nunca desanimar em nenhuma situação.

Ao Álvaro e à Dayane, pelos ensinamentos passados, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao LADOC ou Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central, do qual me orgulho, por ser uma equipe superunida, que me trouxe muito aprendizado.

Aos técnicos do laboratório de doenças Infectocontagiosas da FAMEV-UFU, pela colaboração, em especial à Marília, pela amizade.

À Granja Planalto, que nos doou as galinhas para a realização desse experimento.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.1 Histórico brucelose.....	15
1.2 Brucelose animal.....	16
1.2.1 Conceito e etiologia.....	16
1.2.2 Transmissão e patogenia.....	18
1.2.3 Sinais clínicos.....	18
1.2.4 Tratamento.....	18
1.2.5 Diagnóstico.....	19
1.2.6 Prevenção e controle.....	20
1.2.7 Brucelose bovina.....	21
1.2.8 Brucelose em aves.....	24
1.3 Tecnologia IgY.....	25
1.3.1 Histórico.....	25
1.3.2 Conceito.....	26
1.3.3 Anticorpos das aves.....	26
1.3.4 Conceito, características e vantagens das imunoglobulinas Y.....	27
1.3.5 Estrutura da IgY.....	29
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE.....	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
2.1 INTRODUÇÃO.....	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.2.1 Animais utilizados.....	47
2.2.2 Obtenção do antígeno.....	48
2.2.3 Imunização.....	49
2.2.4 Extração e purificação de imunoglobulinas IgY policlonais totais.....	52
2.2.5 Sorologia das aves.....	53
2.2.5.1 Teste do Antígeno Acidificado tamponado (AAT).....	53
2.2.5.2 Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME).....	54
2.2.5.3 ELISA indireto para confirmar a especificidade de anticorpos IgY.....	54
2.2.5.3.1 Padronização do ELISA indireto.....	55
2.2.5.3.2 Validação do ELISA indireto.....	55
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59

2.4 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE IMUNOGLOBULINAS Y DE GALINHAS IMUNIZADAS COM VACINA B19 E EPS.....	85
RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	86
3.1 INTRODUÇÃO.....	87
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
3.2.1 Amostras utilizadas.....	88
3.2.2 Antígenos utilizados.....	88
3.2.3 ELISA indireto para avaliar a resposta de aves a antígenos diferentes dos utilizados nas imunizações.....	89
3.2.3.1 Padronização do ELISA indireto dos anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas frente a diferentes antígenos utilizados na imunização.....	89
3.2.3.2 Validação do ELISA indireto dos anticorpos IgY extraído da gema do ovo de galinhas imunizadas frente a diferentes antígenos utilizados na imunização.....	90
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.4 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
CAPÍTULO 4 – USO DE IgG BOVINA NO ELISA INDIRETO UTILIZANDO B19 E EPS COMO ANTÍGENOS.....	98
RESUMO.....	98
ABSTRACT.....	99
4.1 INTRODUÇÃO.....	100
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	101
4.2.1 Padronização do ELISA indireto com antígenos vacina B19 e EPS.....	102
4.2.3 Validação do ELISA indireto com antígenos vacina B19 e EPS.....	105
4.2.3 Análise estatística.....	107
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
4.4 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS.....	113
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
ANEXOS.....	116
ANEXO A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA).....	117
ANEXO B – Protocolo das soluções utilizadas no experimento.....	118

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Grupos experimentais e tipo de imunização utilizada.....	49
--	----

Capítulo 4

Tabela 1: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno vacina B19 para amostras de soro sanguíneo de fêmeas bovinas recém-vacinadas com vacina B19 frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.....	109
---	-----

Tabela 2: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno vacina B19 para amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.....	109
--	-----

Tabela 3: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno EPS para amostras de soro sanguíneo de fêmeas bovinas recém-vacinadas com vacina B19 frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.....	111
--	-----

Tabela 4: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno EPS para amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.....	111
---	-----

LISTA DE QUADROS

Capítulo 2

Quadro 1: Resultados do teste AAT realizado em amostras individuais de soro sanguíneo das galinhas do Grupo 1 (controle), Grupo 2 (vacina B19) e Grupo 3 (Extrato proteico solúvel – EPS).....	65
Quadro 2: Resultado dos testes AAT e 2-ME realizado no <i>pool</i> semanal de amostras de IgY extraído da gema do ovo de cada grupo.....	69

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Representação esquemática da IgY de aves e IgG de mamíferos.....	30
--	----

Capítulo 2

Figura 1: Local onde as galinhas eram mantidas durante o experimento.....	47
Figura 2: Imunização via intramuscular no músculo peitoral da galinha.....	50
Figura 3: Esquema de coleta de sangue e imunização de galinhas dos Grupos 1, 2 e 3.....	51
Figura 4: Coleta de sangue na asa de galinhas através da veia ulnar.....	51
Figura 5: Esquema do protocolo do ELISA indireto utilizado na padronização e validação.....	55
Figura 6: Esquema do protocolo utilizado na padronização do ELISA indireto para a placa sensibilizada com EPS.....	57
Figura 7: Esquema do protocolo utilizado na padronização do ELISA indireto para a placa sensibilizada com B19.....	57
Figura 8: Perfil eletroforético do Extrato Proteico Solúvel de <i>Brucella abortus</i> (EPS) e vacina B19.....	60
Figura 9: Representação esquemática da parede celular de micro-organismos Gram-negativos.....	61
Figura 10 (A): Perfil eletroforético da IgY extraída da gema do ovo e purificadas com sulfato de amônio, com gel corado por coloração de prata.....	63
Figura 10 (B): Perfil eletroforético da IgY extraída da gema do ovo e purificadas com sulfato de amônio, com gel corado por coloração <i>Comassie Blue</i> R250 (Sigma).....	63
Figura 11: Curva de absorbância de IgY nas amostras de soros sanguíneo de galinhas dos grupos controle e B19 obtidas pelo teste de ELISA indireto, utilizando como antígeno o B19, durante 13 semanas.....	72
Figura 12: Curva de absorbância de IgY nas amostras de soros de galinhas dos grupos controle e EPS obtidas pelo teste de ELISA indireto, utilizando como antígeno o EPS, durante 13 semanas.....	72
Figura 13: Cinética de produção de IgY nas amostras de gema de ovo de galinhas imunizadas com os antígenos vacina B19 e EPS obtida pelo teste de ELISA indireto durante 13 semanas.....	73

Capítulo 3

Figura 1: Esquema do protocolo utilizado na validação do teste ELISA indireto para as placas sensibilizadas com vacina B19 e EPS.....	91
Figura 2: Cinética do reconhecimento de antígenos através de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas com B19, EPS e controle, frente ao antígeno EPS.....	93
Figura 3: Cinética do reconhecimento de antígenos através de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas com B19, EPS e controle, frente ao antígeno B19.....	93

Capítulo 4

Figura 1: Modelo da padronização do ELISA indireto de placas sensibilizadas com antígenos vacina B19 e EPS.....	104
Figura 2: Modelo da validação do ELISA indireto de placas sensibilizadas com antígenos vacina B19 e EPS.....	106
Figura 3: Resultados da validação ELISA indireto das placas sensibilizadas com o antígeno vacina B19.....	108
Figura 4: Resultados da validação ELISA indireto das placas sensibilizadas com o antígeno EPS.....	108

PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgY PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

RESUMO - A dissertação foi dividida em cinco capítulos. O primeiro foi denominado “Consideração Gerais”, no qual foi realizada uma breve revisão de literatura sobre o que foi proposto no trabalho. No segundo capítulo, objetivou-se verificar se galinhas imunizadas com vacina B19 de *Brucella abortus* e extrato proteico solúvel extraído dessa vacina, poderiam produzir anticorpos policlonais específicos, detectáveis em testes de ELISA indireto. Foram imunizadas seis galinhas com 25 semanas de idade, da linhagem *White Leghorn*, sendo duas imunizadas com a vacina B19, duas com uma solução de extrato proteico solúvel extraída a partir da vacina B19 e duas foram usadas como controle, sendo imunizadas com PBS. Coletas de sangue foram realizadas quinzenalmente, e de ovos, diariamente durante 13 semanas. Anticorpos policlonais IgY foram purificados a partir da gema dos ovos utilizando para a delipidação o método de diluição em água acidificada (pH 5,0 – 5,2) e a precipitação com sulfato de amônio (20%). Realizou-se teste de ELISA indireto para verificar a especificidade da IgY. Foi possível observar a produção de anticorpos policlonais específicos contra os antígenos utilizados nas imunizações, tanto no soro quanto nas gemas. No terceiro capítulo, objetivou-se verificar a resposta da IgY extraída da gema do ovo de galinhas imunizadas com vacina B19 (IgY anti-B19) frente ao antígeno EPS e a resposta da IgY extraída da gema do ovo de galinhas imunizadas com EPS (IgY anti-EPS) frente ao antígeno vacina B19, utilizando-se o ELISA indireto, a fim de verificar possíveis interações antígeno-anticorpo. Para isso, foram sensibilizadas duas placas de microtitulação, uma utilizando como antígeno a vacina B19 e outra com antígeno o EPS, em cada placa foram colocados como anticorpos primários IgY extraída da gema do ovo, referente a cada grupo de galinhas imunizadas, sendo um grupo de galinhas imunizadas com vacina B19, um com EPS e um controle. Tanto IgY anti-B19 como IgY anti-EPS foram reagentes aos antígenos testados, portanto, acredita-se que esses anticorpos possam servir de ferramenta na identificação de antígenos em testes diagnósticos que visam este fim. O quarto capítulo teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados e recém-vacinados com a vacina B19 frente aos antígenos EPS e vacina B19 em ELISA indireto. Utilizou-se nesse estudo 96 amostras de soro sanguíneo de bovinos, sendo 32 de bezerras recém-vacinadas, 32 de animais naturalmente infectados e 32 de animais negativos para brucelose. Verificou-se que o teste de ELISA indireto com o antígeno EPS, quando comparado aos testes de ELISA indireto com o antígeno vacina B19 e ao 2-ME, foi capaz de diferenciar os animais recém-vacinados dos animais naturalmente infectados. No quinto capítulo estão as “considerações finais” sobre toda a dissertação, incluindo conclusões relativas a todos os capítulos.

Palavras-chave: Imunoglobulinas. Galinhas. *Brucella abortus*.

PRODUCTION AND USE OF IgY ANTIBODIES FOR DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS

ABSTRACT - The dissertation was divided into five chapters. The first was called "General Consideration," which was performed a brief literature review about what was proposed in the work. In the second chapter aimed to check whether chickens immunized with *Brucella abortus* B19 vaccine and soluble protein extract solution, extracted from this vaccine, could produce specific polyclonal antibodies, detectable in indirect ELISA tests. Six hens with 25 week-old, White Leghorn breed, were immunized, two immunized with B19, two with a soluble protein extract solution extracted from the B19 vaccine and two were used as controls, being immunized with PBS. Blood samples were taken fortnightly and eggs daily for 13 weeks. Polyclonal antibodies IgY were purified from egg yolk using for delipidation the dilution method in acidified water (pH 5,0-5,2) and precipitation with ammonium sulfate. Was performed ELISA test to verify the specificity of IgY. Was possible to observe the production of specific polyclonal antibodies against the antigens used in the immunizations, both in serum and in egg yolks. In the third chapter aimed to check the response of IgY extracted from egg yolk of immunized chickens with B19 vaccine (IgY anti- B19) against the antigen EPS and the response of IgY extracted from egg yolk of immunized chickens with EPS (IgY anti-EPS) against the vaccine antigen B19, using the ELISA in order to verify possible antigen-antibody interactions. For this, two microtiter plates were sensitized, in one of them using B19 vaccine as antigen and another EPS antigen, were placed on each plate as primary antibodies IgY extracted from the egg yolk, for each group of immunized hens, a group immunized chickens with vaccine B19, one with EPS and one control. Both IgY anti-B19, as IgY anti-EPS were reactive to the antigens tested, so it is believed that these antibodies may serve as a tool for the identification of antigens in diagnostic tests aimed at this purpose. The objective of fourth chapter was to evaluate the humoral immune response of cattle naturally infected and newly vaccinated with B19 vaccine against EPS and B19 vaccine antigens in indirect ELISA. Was used in this study 96 samples of blood serum of cattle, 32 heifers recently vaccinated with B19 vaccine, 32 naturally infected cattle and 32 negative cattle for brucellosis. Was verified that in the indirect ELISA with antigen EPS when compared with indirect ELISA with antigen vaccine B19 and 2-ME, this test was able to distinguish newly vaccinated animals of naturally infected animals. The fifth chapter are the "final thoughts" on the entire dissertation, including findings of all the chapters.

Keywords: Immunoglobulin. Chickens. *Brucella abortus*.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Histórico brucelose

Apesar de ser uma enfermidade dos animais, a brucelose foi inicialmente descrita no homem no início do século XIX, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta (POESTER, 2009).

Em 1861, Marston, um médico cirurgião assistente do Departamento Médico Britânico, fez a primeira descrição clínica da doença em si mesmo como “febre gástrica remitente” (MARSTON, 1861; MANTUR; AMARNATH; SHINDE, 2007).

A causa desta doença foi obscura até 1887, quando David Bruce (1855-1931), um médico cirurgião do exército britânico, isolou do baço de um homem que havia morrido de “Febre de Malta”, um cocobacilo, e o chamou de “*Micrococcus melitensis*” (BRUCE, 1887). A bactéria foi mais tarde renomeada como *Brucella melitensis* em homenagem a David Bruce.

Esta doença era endêmica, mas confundida com outras doenças, especialmente malária. A incidência anual média em Malta, durante 1901-1906, foi de 652 civis e 605 militares, com uma taxa de letalidade, respectivamente de 10,4% e 2,3% (EYRE, 1908).

Em 1897, os veterinários Bang e Stribolt, na Dinamarca, isolaram e identificaram uma bactéria intracelular de vacas que abortaram, denominando-a *Bacillus abortus bovis* (CRAIG, 1903; PACHECO; MELLO, 1956)

Zammit, em 1905, demonstrou, ainda em Malta, a natureza zoonótica da *Brucella melitensis* através do isolamento da bactéria do leite de cabras. Desta forma, a doença em humanos foi associada à pessoas que consumiram leite de cabra ou teve contato próximo com esses animais.

Em 1914, a partir de abortamento suíno, Traum isolou um tipo de brucela que se distinguia das demais por certas propriedades bioquímicas e antigênicas. O problema já havia sido estudado por Huttyra em 1909, na Hungria. A princípio a bactéria foi chamada de *Bacillus abortus suis*, por ser confundida inicialmente com a causadora dos abortos nos bovinos e, posteriormente, de *Brucella suis* (PACHECO; MELLO, 1956).

Em 1918, a médica Alice Evans identificou, pela primeira vez, a brucelose em humanos nos EUA, informando haver relação íntima do *Bacillus abortus* com o *Micrococcus melitensis*, concluindo que as bactérias isoladas de caprinos, bovinos e

humanos eram similares e que o *Micrococcus melitensis* era, na verdade, um bacilo, e não um coco como originalmente descrito. Também sugeriu que a doença passasse a se chamar brucelose, em homenagem a Bruce. Dois anos depois, Meyer e Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* (PACHECO; MELLO, 1956).

A partir de então outras espécies foram acrescentadas ao Gênero. Cronologicamente seguiram-se: *Brucella ovis* (BUDDLE; BOYES, 1953), *Brucella neotomae* (STOENNER; LACKMAN, 1957), *Brucella canis* (CARMICHAEL; BRUNER, 1968), *Brucella pennipediaлис* (focas e golfinhos) (ROSS et al., 1994), *Brucella ceti* (baleias) (FOSTER et al., 1996) e mais recentemente a *Brucella microti* (SCHOLZ et al., 2008).

1.2 Brucelose animal

1.2.1 Conceito e etiologia

A brucelose é uma importante doença causada por bactéria Gram-negativa e intracelular facultativa do gênero *Brucella*, altamente patogênica para uma ampla variedade de animais selvagens e domésticos, incluindo o ser humano. A doença é também chamada de “febre de Malta”, “febre do Mediterrâneo ou febre ondulante”. Os principais animais domésticos afetados são bovinos, caprinos, ovinos e suínos (MOORE; SCHNURRENBERGER, 1981; YOUNG, 1995; SANGARI; AGUERO, 1996; CORBEL, 1997; OIE, 2000).

A *Brucella* é um dos principais patógenos zoonóticos do mundo, e é responsável por inúmeras perdas econômicas nos rebanhos de produção, bem como uma considerável morbidade humana em áreas endêmicas (BOSCHIROLI; FOULONGNE; O’CALLAGHAN, 2001; BRASIL, 2006).

Seis espécies eram reconhecidas dentro do gênero *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. Esta classificação baseia-se principalmente na diferença da preferência pelo espécie de hospedeiro e da patogenicidade (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984; ALTON et al., 1988).

Porém, de acordo Foster et al. (2007) e Scholz et al. (2008), o gênero *Brucella* é composto por nove espécies. *Brucella neotomae* e *Brucella microti*, isoladas de roedores silvestres, não são consideradas zoonóticas (CORBEL, 1997; SCHOLZ et al.,

2008). *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, patogênicas para mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2007), e já foram relatados casos em humanos.

No Reino Unido, foi isolado a partir de mamíferos marinhos, um grupo de brucelas distinto das espécies conhecidas, as quais foram referidas provisoriamente como *B. maris* (CORBEL, 1997).

Epidemiologicamente, três principais espécies de *Brucella* são distinguidas com base na sua virulência para seres humanos e sua predileção por determinado hospedeiro animal: *Brucella abortus* para bovinos, *Brucella melitensis* para caprinos e *Brucella suis* para suínos, sendo *Brucella melitensis* e *Brucella suis* as principais responsáveis por causar casos clínicos em humanos (SANGARI; AGUERO, 1996; CORBEL, 1997).

No caso da *Brucella ovis*, não foi demonstrado que ela causa doenças no humano, no entanto, ela é encontrada principalmente em ovinos. Já a *Brucella canis* pode causar a doença em humanos, embora seja raro, mesmo em países onde as infecções em cães são bastante comuns (CARMICHAEL, 1990).

Com base no aspecto das colônias obtidas no meio sólido, as diferentes espécies de *Brucella* se classificam habitualmente como lisas (S) ou rugosas (R) (PAULIN, 2003; CASTRO; GONZÁLEZ; PRAT, 2005).

Quando lisas, possuem uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático contendo uma camada de peptidoglicano e uma parede externa (PE). Na PE existe uma estrutura formada por moléculas de constituição lipopolissacarídeo, LPS, composta pelos lipídios A, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacarídica mais exposta denominada cadeia O, associada aos epítomos A ou M (PAULIN, 2003). Quando rugosas não apresentam cadeia O no lipopolissacarídeo da parede celular (BRASIL, 2006).

Entre as lisas estão *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. neotomae* e as espécies rugosas são *B. ovis* e *B. canis*. O aspecto que as colônias adquirem se deve a expressão do lipopolissacarídeo (LPS) na superfície bacteriana, LPS-S nas lisas e LPS-R nas rugosas (CASTRO; GONZÁLEZ; PRAT, 2005).

As cepas de brucela na fase lisa são as mais virulentas, e sua estrutura é semelhante à de algumas enterobactérias (*Yersinia enterocolítica*, *Salmonella Iandau*, *Pseudomona maltophilia*, *Escherichia coli*) (CORBEL; STUART; BREWER, 1984). As duas únicas espécies naturalmente rugosas são *Brucella canis*, causadora da brucelose canina e considerada a menos patogênica para o homem, e *Brucella ovis*, que só foi encontrada infectando naturalmente ovinos (CORBEL, 1997).

1.2.2 Transmissão e patogenicia

A transmissão da brucelose pode ocorrer por contato direto com tecidos de animais infectados e por via transplacentária; e por contágio indireto pela ingestão de alimentos e água contaminados com a bactéria (CASTRO; GONZALEZ; PRAT, 2005), fômites e inseminação artificial (BRASIL, 2006).

Após a invasão corpórea, a bactéria localiza-se inicialmente em linfonodos regionais, e, após ganhar a circulação sanguínea, coloniza o útero, o úbere, as cápsulas articulares e as membranas sinoviais. Posteriormente, outros tecidos são infectados, como o baço e os linfonodos mamários e ilíacos (RADOSTITS et al., 2002).

1.2.3 Sinais clínicos

A brucelose é uma doença subaguda ou crônica que pode manifestar-se de maneira distinta conforme o hospedeiro, podendo afetar várias espécies de animais (BRASIL, 2006; CORBEL, 2006).

Em bovinos, ovinos, caprinos, outros ruminantes e suínos, a fase inicial após a infecção muitas vezes não é aparente. Em animais sexualmente maduros, a infecção localiza-se no sistema reprodutivo e normalmente produz placentite seguida de aborto na fêmea prenhe, geralmente durante o terço final da gestação. No macho, pode provocar epididimite e orquite (CORBEL, 2006).

As lesões no trato reprodutor, na placenta e no feto de bovinos, ovinos, suínos e caprinos levam à infertilidade, associadas ou não ao abortamento (OCHOLI et al., 2005).

As infecções brucélicas nos animais domésticos estão associadas principalmente a problemas reprodutivos como abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade, com efeitos desastrosos para a pecuária (POESTER et al., 2009).

1.2.4 Tratamento

A brucelose em animais de produção não possui um tratamento específico, pois as brucelas são intracelulares facultativas, requerendo o uso de antibióticos com boa penetração durante períodos prolongados, além da utilização combinada de classes

desses medicamentos, tornando o tratamento inviável devido aos custos e muitas vezes os sinais clínicos não desaparecem, reduzindo apenas o surgimento de complicações (ESTEIN, 1999).

O tratamento de animais pertencentes à rebanhos comerciais com antibióticos não é prático nem tampouco econômico, pois além do alto valor dos medicamentos e do longo período exigido, não raro ocorrem recidivas. Além disso, o uso prolongado de antibióticos pode ter reflexos na saúde pública, uma vez que tendem a persistir na carne e no leite (POESTER, 2009). Portanto nesses rebanhos, principalmente em bovinos, o tratamento não deve ser realizado, sendo que por questões epidemiológicas é recomendado o sacrifício dos animais.

Em animais de estimação, como cães, o tratamento com antibióticos, apesar de caro pode ter algum sucesso (POESTER, 2009).

Diante disso, o diagnóstico preciso e seguro se torna necessário para a implantação de um controle racional e para a erradicação da doença (MÓLNAR et al., 2002).

1.2.5 Diagnóstico

Sinais clínicos não são patognomônicos, e o diagnóstico é dependente da demonstração da presença de *Brucella* spp. ou por isolamento das bactérias ou de detecção dos seus antígenos ou material genético, ou pela demonstração de anticorpos específicos (testes sorológicos) ou resposta imunológica celular (CORBEL, 2006).

Os testes de diagnóstico se dividem em duas categorias: aqueles que demonstram a presença dos organismos através de isolamento e identificação da bactéria (métodos diretos), tais como, imuno-histoquímica, e métodos de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR); e os que detectam uma resposta imune ao antígeno (métodos indiretos), como os testes sorológicos, tais como, testes de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), soroaglutinação, fixação de complemento, teste no leite, teste intradérmico e teste de polarização fluorescente (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006; CORBEL, 2006).

1.2.6 Prevenção e controle

Por causar prejuízos à pecuária e por ser transmitida dos animais para o homem, desde o início do século XX, muitos países têm adotado medidas de controle ou erradicação da brucelose na população animal (POESTER et al., 2009).

Alguns pontos são fundamentais para a prevenção, o controle e a erradicação da brucelose animal (CORBEL, 2006).

Para prevenção, é importante manter o cuidado com a higiene do rebanho; a vacinação é útil para prevenção e controle da infecção. Alguns países que possuem programas de controle da doença adotam a vacina com *Brucella abortus* cepas B19 e RB51 para a prevenção da brucelose bovina e a vacina com *Brucella melitensis* REV1 para a prevenção da infecção por *Brucella melitensis* em ovinos e caprinos, porém a eficácia da vacina pode ser limitada quando houver uma exposição de animais em ambientes carregados com a bactéria causadora da doença (CORBEL, 2006).

Desde que o animal infectado é um disseminador da doença, a chave para evitar a doença em humanos é o controle da doença em animais. Os problemas apresentados pela brucelose animal requerem soluções práticas. Testes de baixo custo, de fácil execução, rápidos e específicos para a identificação de animais infectados. O regime de testes diagnósticos e sacrifícios e embargo rigoroso no transporte e venda de animais infectados usado em muitos países para erradicação da doença, torna importante a capacidade de distinguir entre um animal que está infectado com a bactéria virulenta e um animal vacinado com uma estirpe viva e atenuada ou inativada da vacina (BOSCHIROLI; FOULONGNE; O'CALLAGHAN, 2001).

Em muitos países, os métodos para controle da brucelose são apoiados por regulamentação governamental ou legislação. Em outros, não existem autoridades para estabelecer programas de controle da doença. Portanto, os procedimentos para o gerenciamento de manadas e rebanhos infectados podem variar muito. No entanto, certos princípios são conhecidos, como teste e isolamento ou abate dos animais infectados, higiene, controle de movimentação de animais e vacinação. A erradicação só pode ser alcançada através do teste e abate dos animais positivos para a doença, combinado com medidas eficazes de prevenção e controle da circulação de animais (CORBEL, 2006).

No Brasil, as formas de controle existentes são baseadas no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT),

implementado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001. Este Programa está direcionado ao controle da doença em bovinos e bubalinos, porém, tais formas de controle podem ser aplicadas a outras espécies de animais de produção, tais como ovinos, caprinos e suínos, com exceção da vacinação, que não é utilizada no Brasil nessas espécies animais.

1.2.7 Brucelose bovina

A brucelose bovina é uma zoonose de distribuição mundial e caracterizada por abortos em vacas prenhes. A doença é causada por *Brucella abortus*, a qual é capaz de sobreviver e multiplicar nos tecidos do sistema retículo-endotelial (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993).

No Brasil, a doença é endêmica, sendo a sua ocorrência registrada em todo o território brasileiro (PAULIN; FERREIRA NETO, 2002).

As prevalências obtidas foram: no estado da Bahia, 0,66% (total de 10.816 animais examinados) (ALVES et al., 2009); no Distrito Federal, 0,16% (2.019 animais examinados) (GONÇALVES et al., 2009); no Espírito Santo, 3,5% (5.351 animais examinados) (AZEVEDO et al., 2009); em Goiás, 1,4% (10.744 animais examinados) (ROCHA et al., 2009); em Minas Gerais, 1,1% (20.643 animais examinados) (GONÇALVES et al., 2009), no Mato Grosso do Sul, 7,6% (9.466 animais de corte examinados) (CHATE et al., 2009); no Mato Grosso, 10,2% (13.684 animais examinados) (NEGREIROS et al., 2009); no Paraná, 1,7% (14.857 animais examinados) (DIAS et al., 2009); no Rio de Janeiro, 4,1% (8.239 animais examinados) (KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009); em Rondônia, 6,2% (9.717 animais examinados) (VILLAR et al., 2009); no Rio Grande do Sul, 1,0% (16.072 animais examinados) (MARVULO et al., 2009); em Santa Catarina, 0,06% (7.801 animais examinados) (SIKUSAWA et al., 2009); no Sergipe, 3,4% (4.757 animais examinados) (SILVA et al., 2009); em São Paulo, 3,8% (8.761 animais examinados) (DIAS et al. 2009); e no Tocantins, 4,4% (20.908 animais examinados) (OGATA et al., 2009).

Nota-se que a prevalência mais baixa obtida foi no Estado de Santa Catarina, de 0,06%, para um total de 7.801 animais examinados.

A enfermidade leva a grandes prejuízos diretos ou indiretos, como honorários médicos veterinários, da manipulação de vacina, de animais enfermos, condenação do

leite e da carne, como também a sua desvalorização no mercado externo e altos custos com programa de erradicação, controle e pesquisas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Pelas características da doença, não se recomenda o tratamento da brucelose, sendo este proibido (MARQUES, 2003). O controle da brucelose apoia-se basicamente em ações de vacinação de bezerras e separação e eliminação dos portadores da doença (SAMARTINO et al., 2000; RIET-CORREA et al., 2001). A eliminação dos portadores da doença só é recomendada após realização de testes diagnósticos.

As vacinas utilizadas em programas governamentais de controle da doença são vivas e atenuadas. Duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), são as mais empregadas: a B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51) (BRASIL, 2006).

A vacinação de fêmeas com *Brucella abortus* cepa 19 (B19) tem sido usada no mundo inteiro para prevenir a doença em bovinos. A vacina B19 é viva, atenuada e apresenta níveis variáveis de proteção, dependendo da prevalência da doença (NICOLETTI, 1990).

A vacina B19 é uma amostra lisa de *Brucella abortus* e é empregada em bezerras de 3 a 8 meses de idade em dose única via subcutânea (BRASIL, 2006).

Também chamada anabortina, a vacina com a cepa B19 é a mais utilizada, entretanto, como toda vacina, ela apresenta vantagens e desvantagens. É uma cepa estável, não se multiplica em presença do eritritol e causa mínimas reações locais e sistêmicas após sua inoculação (ALTON et al., 1988). Estimula o sistema imune do animal vacinado a resistir à doença, induzindo a produção de anticorpos específicos contra o lipopolissacarídeo liso (sLPS) da parede celular da *B. abortus*. Normalmente um animal vacinado será resistente à doença por um período extenso de tempo (8-10 anos), porém os anticorpos detectáveis desaparecerão em poucos meses, não sendo detectados quando a fêmea estiver com idade superior a 24 meses (RICKEY; HARRELL, 1997).

Preparada a partir de cepa atenuada de *B. abortus*, a B19 induz a imunidade celular e humoral. Os anticorpos decorrentes da imunidade humoral são reduzidos a níveis não detectáveis ou discrimináveis em sorologia realizada quando os animais chegam à fase adulta (acima de 24 meses de idade). Esta vacina protege os animais contra o aborto, mas não impede totalmente a infecção, principalmente no úbere (ISHIZUKA, 2003).

O fato da vacina B19 induzir anticorpos contra a cadeia O do LPS liso da parede celular das brucelas, e isso interferir com o diagnóstico sorológico, estimulou a procura por mutantes rugosas, livres da cadeia O, estáveis e atenuadas o suficiente para produzir colonização do hospedeiro por algumas semanas, provocando resposta imune específica e duradoura (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A vacina RB51 é uma estirpe mutante criada a partir da *Brucella abortus* cepa 2308, após sucessivas passagens em meios contendo antibiótico rifampicina. Esta estirpe apresenta características de proteção semelhantes às da estirpe B19, gerando resposta imune celular e humoral, porém sem induzir a formação de anticorpos anti-LPS liso, não interferindo assim, no diagnóstico sorológico convencional da doença (SCHURIG et al., 1991).

O uso da vacina RB51 só é recomendado para bezerras acima de 8 meses de idade que não foram vacinadas com a vacina B19 (BRASIL, 2006).

Para o diagnóstico da doença, o programa brasileiro prevê o uso sequencial dos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como teste de triagem, sendo os soros com resultado positivo submetidos a confirmação, que pode ser realizada pela combinação da prova de soroaglutinação lenta com a prova do 2-mercaptoetanol ou então pela reação de fixação de complemento (MATHIAS; MEIRELLES; BUCHALA, 2007).

Outros testes podem ser empregados, como o iELISA (ELISA indireto), no qual utiliza-se como antígeno lipopolissacarídeo de *Brucella abortus*, porém, assim como o AAT, este teste possui alta sensibilidade e especificidade menor, por isso muitas reações falso positivas podem ocorrer (BRASIL, 2006). O ELISA indireto (iELISA) é um dos testes recomendados para comércio internacional pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), embora não seja encontrado facilmente no comércio brasileiro, por não ser recomendado como teste oficial.

Esta doença é prioritária para o Governo Federal e está incluída no Programa Nacional de Controle e de Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), o qual foi criado em 2001 com o objetivo de diminuir o impacto negativo de zoonoses como, brucelose e tuberculose, na saúde humana e animal, e promove a competitividade da pecuária nacional. Este programa prevê que, após resultado positivo no diagnóstico para brucelose, o animal deverá ser sacrificado (BRASIL, 2006).

1.2.8 Brucelose em aves

Um hábito comum das aves selvagens e caipiras é viver em pastos e celeiros, muitas vezes em contato com bovinos e suínos; desta forma, tornam-se um reservatório potencial, o qual tem sido estudado (SPINK, 1956).

As aves são susceptíveis à infecção por brucela. A bactéria tem sido relatada como sendo a causa do decréscimo na produção de ovos em galinhas infectadas com a presença de brucela na casca do ovo, na gema do ovo, nas fezes e em órgãos internos de aves infectadas (ABDALLAH et al., 1984), podendo servir de importante fonte de brucela para o homem e outros animais (ABDU; ADESIYUN; ABDULLAHI, 1984; GUGONG et al., 2012;).

A reatividade de galinhas em testes diagnósticos para brucelose foi documentada em galinhas na Nigéria por Bale e Nuru em 1982, Abdu et al. em 1984, Kudi et al. em 1997b e Janaidu et al. em 2006., segundo dados compilados por Gugong et al. (2012).

Muitas das galinhas locais na Nigéria são criadas livres em um sistema no qual elas são mantidas com outros animais, como bovinos, caprinos e ovinos (JANAIDU et al., 2006). Este sistema as predispõe a infecção por brucela através do contato com esses animais, anexos fetais resultantes de abortos por brucelose e materiais contaminados (ANGUS; BROWN; GUE, 1971).

Abdallah et al. (1984) realizaram um estudo experimental utilizando 30 galinhas de 1 dia de idade e 50 de 6 meses de idade. Nesse estudo, eles observaram que as galinhas de 1 dia de idade expostas a *Brucella abortus* não apresentaram sinais clínicos, no entanto micro-organismos foram isolados de 2 dos 10 casos infectados; 4 galinhas das 10 expostas a *Brucella melitensis* mostraram sinais da doença 48-72 horas após a infecção, com morte dentro de 12-36 horas após o aparecimento dos sintomas; neste grupo, micro-organismos foram isolados de 6 das 10 galinhas infectadas. As galinhas adultas (6 meses), quando foram expostas à brucela, não mostraram sinais clínicos, exceto um decréscimo na produção de ovos entre as galinhas infectadas intraperitonealmente com *Brucella melitensis*. No entanto a brucela foi isolada de fezes, casca do ovo, gema e clara do ovo, e de alguns órgãos internos de algumas galinhas. Nesse estudo também foi observado que as brucelas isoladas das galinhas infectadas foram idênticas às cepas utilizadas. Nas fezes das galinhas sobreviventes inoculadas com *Brucella melitensis*, a brucela ainda foi encontrada por 48 dias.

Juntamente com as perdas econômicas resultantes da infecção por *Brucella melitensis* das galinhas de um dia de idade, os resultados obtidos garantem a significância da infecção em galinhas, e seus ovos e fezes disseminando brucelose para seres humanos e animais (ABDALLAH et al., 1984).

Em contrapartida, Kumar et al. (1984), em estudo experimental inoculando *Brucella abortus* em galinhas, não conseguiram isolar este microorganismo de fezes e órgãos internos das mesmas, sugerindo que as aves são resistentes a infecção por brucela, levando-a à morte.

1.3 Tecnologia IgY

1.3.1 Histórico

Em 1893, Klemperer descreveu um experimento no qual ele demonstrou que a imunização de uma galinha resulta na transferência de proteínas neutralizantes, chamadas de anticorpos IgY (y = yolk), para a gema do ovo (KLEMPERER, 1893 apud NARAT, 2003).

Por um longo período não existiu aplicação científica para esse conhecimento, mas quando o bem-estar animal se tornou uma séria questão de preocupação ética para a comunidade científica, os resultados de Klemperer ganharam interesse (SCHADE et al., 2001; GUIMARÃES; CORREIA; FILHO, 2008).

A partir de 1959, vários trabalhos começaram a ser publicados relacionando o uso da IgY como anticorpo secundário para kits de diagnóstico. Na década de 1990, a tecnologia de IgY teve reconhecimento internacional (SCHMIDT et al., 1989) e foi oficialmente aprovada pela comunidade europeia como método alternativo para produção de anticorpos, de forma a atender o bem-estar animal. Enquanto isso, inúmeras publicações têm reportado muitos aspectos desta tecnologia (GUIMARÃES; CORREIA; FILHO, 2008).

Na década de 1990, a produção e o uso do IgY tanto na pesquisa como no diagnóstico era chamada de “Tecnologia IgY”. Essa tecnologia tornou possível a utilização de um método alternativo que permite que as imunoglobulinas (IgY) sejam obtidas da gema do ovo. Em mamíferos, a obtenção de anticorpos exige dois estágios de manipulação do animal, sendo o primeiro a imunização e o segundo a obtenção de

anticorpos. Já na galinha, um dos passos invasivos de obtenção de imunoglobulina é evitado, pois a coleta de sangue é substituída pela obtenção de anticorpos da gema do ovo, havendo redução de estresse dos animais utilizados na produção de anticorpos (SCHADE et al., 2001).

Atualmente, várias pesquisas estão sendo realizadas. Esta tecnologia consiste na imunização de galinhas com antígenos de interesse e extração de IgY policlonais específicos da gema do ovo.

1.3.2 Conceito

Tecnologia IgY é uma técnica que apresenta muitas vantagens econômicas quando comparada às técnicas utilizadas de extração de anticorpos de mamíferos. Galinhas têm um menor custo no mercado e são de fácil manipulação, não é necessária sangria para coleta de imunoglobulinas, pois somente ovos são coletados após imunização, a produção e o isolamento de IgY são rápidos e simples, pequena quantidade de antígeno é necessária na imunização para obter longo período de títulos de imunoglobulina na gema de ovos e consequentemente, altas taxas de anticorpos são extraídas, e essas imunoglobulinas podem ser utilizadas de forma similar a anticorpos de mamíferos (ARAÚJO, 2007).

1.3.3 Anticorpos das aves

O soro das aves possui três principais classes de imunoglobulina, IgA, IgY e IgM (BURNS; MAXWELL, 1981; CHEN et al., 1982; DAVIS; REEVES, 2002; CARLANDER, 2002). Sabe-se que a imunoglobulina sérica IgY é transferida através do epitélio folicular do ovário e acumulada na gema durante a oogênese, de maneira similar à transferência placentária de IgG em mamíferos (DAVIS; REEVES, 2002; CARLANDER, 2002).

Sendo a IgY o principal anticorpo produzido nas aves, apresenta funções equivalentes à IgG nos mamíferos, e a IgA e a IgM são homólogas às de mamíferos (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; SHARMA, 2003; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Historicamente, IgY, a maior classe de imunoglobulina presente no soro sanguíneo e na gema do ovo era chamada de IgG de aves, devido a semelhança da sua função e concentração sérica em comparação com IgG de mamíferos. No entanto, tornou-se claro que o uso dessa denominação era inadequado, especialmente por causa das fundamentais diferenças estruturais entre as moléculas IgG e IgY (CHALGHOUIMI et al., 2009). Além disso, estruturalmente, a IgY assemelha-se mais com a IgE do que com a IgG de mamíferos, uma vez que a sequência de DNA da IgY das galinhas apresenta maior semelhança com a IgE (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995).

A IgY é continuamente sintetizada, secretada para o sangue e transferida para a gema de ovo, onde se acumula, através de um receptor na superfície da membrana da gema específico pra translocação de IgY (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; MORRISON et al., 2002; TESAR; CHEUNG; BJORKMAN, 2008), enquanto IgA e IgM são depositadas na clara de ovo em quantidades limitadas (ROSE; ORLANDS; BUTTRESS, 1974; DAVIS; REEVES, 2002; CARLANDER, 2002). Esse acúmulo de IgY na gema é responsável pela imunidade passiva a embriões e neonatos pois a produção de IgY em pintinhos, começa apenas seis dias após a eclosão (ZHANG, 2003; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

1.3.4 Conceito, características e vantagens das imunoglobulinas Y

A IgY é assim classificada porque os anticorpos maternos são transferidos do soro para a gema (yolk, em inglês), conferindo imunidade passiva para embriões e neonatos (KLEMPERER, 1893 apud TINI et al., 2002). Ela está presente em peixes pulmonados, anfíbios, répteis e aves (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; MORRISON et al., 2002).

Esta imunoglobulina está presente no sangue circulante, na gema de ovo e também no conteúdo duodenal, na secreção traqueal e no líquido seminal (LESLIE; CLEM, 1969).

As imunoglobulinas Y (IgY) são moléculas com elevada especificidade para a ligação e inativação de substâncias externas, tais como moléculas tóxicas ou antigênicas, que são capazes de invadir o corpo (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

A capacidade desses anticorpos de reconhecer moléculas com alta especificidade fez deles uma ferramenta indispensável em laboratórios, principalmente na pesquisa de novos métodos diagnósticos, terapias e vacinas. Atualmente, a maioria dos anticorpos disponíveis para esse objetivo são produzidos em mamíferos, requerendo assim o uso de animais de laboratório (coelhos, ratos, camundongos e cobaias) ou mamíferos de maior porte (cavalos, ovelhas e cabras) (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; CHALGHOUMI et al., 2009).

Sendo assim, para garantir o bem estar animal o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) recomenda o uso de anticorpos de galinhas como alternativa aos anticorpos de mamíferos (SCHADE et al., 1996). Isto porque a utilização de galinhas reduz o número de animais utilizados, já que estas produzem maior quantidade de anticorpo quando comparadas aos animais de laboratório comumente usados (camundongo e coelho) e ainda a coleta de sangue pode ser substituída por extração do anticorpo a partir da gema de ovo, minimizando assim o sofrimento animal (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

A utilização de IgY de galinha, em vez de IgG de mamíferos apresenta inúmeras vantagens, como: redução do número de animais, uma vez que galinhas podem produzir até 18 vezes mais anticorpo do que coelhos, redução de custo, bem estar animal (SCHADE et al., 1996; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

A quantidade de IgY na gema varia de 60 a 150mg/ovo, dependendo de vários fatores, como idade, raça e antígeno utilizado (PAULY et al., 2009; COOK; TROTT, 2010). Uma galinha pode produzir aproximadamente 325 ovos/ano, e isso pode resultar num rendimento potencial de cerca de 20-40 g de IgY por ano (PAULY et al., 2009), dos quais 2% a 10% é o antígeno específico (SCHADE et al., 1991; TINI et al., 2002).

A distância filogenética entre galinhas e mamíferos torna possível a produção de anticorpos contra proteínas altamente conservadas de mamíferos, e ainda é necessária uma quantidade menor de antígeno para produzir uma resposta imune eficiente (LARSSON; CARLANDER; WILHELMSSON, 1998).

A distância evolutiva também determina que a IgY, ao contrário do IgG, não ativa o complemento, não interage com as proteínas estafilocócica A e estreptocócica G, ao fator reumatóide e ao receptor Fc da superfície celular, o que reforça as vantagens da utilização de IgY como anticorpo primário em alguns tipos de imunodiagnóstico

(HÄDGE; ANBROSUIUS, 1984; TINI et al, 2002; CARLANDER, 2002; ZHANG, 2003; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Além disso, anticorpos de galinha podem reconhecer epítomos diferentes dos anticorpos reconhecidos por mamíferos, aumentando assim o número de anticorpos diferentes e consequentemente a possibilidade de ligação (CARLANDER et al., 1999).

A IgY pode ser facilmente isolada a partir da gema por técnica de precipitação, uma vez que na gema encontra-se somente IgY, em contraste com o soro de mamíferos onde se encontram várias classes de anticorpos (GASSMANN et al., 1990).

Além dos benefícios já citados, a IgY é particularmente estável a altas temperaturas e variações de pH (SHIMIZU et al., 1992) e exibem elevada avidéz mesmo após a primeira imunização.

1.3.5 Estrutura da IgY

A IgY tem uma massa molecular que varia entre 167 kDa a 180 kDa, a qual é mais pesada que a IgG de mamíferos de aproximadamente 150 kDa. O ponto isoelétrico varia entre 5,7 e 7,6 (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004; CHALGHOUMI et al., 2009).

A IgY é uma imunoglobulina análoga à IgG dos mamíferos e é composta de duas cadeias leves e duas pesadas. Estas últimas contêm um domínio variável (V_H) e quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}), apresentando diferenças em suas características bioquímicas e funções imunológicas que se devem à sequência de aminoácidos e a diferenças estruturais, diferente da IgG de mamífero, que tem três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}), como mostra a Figura 1 (CARLANDER, 2002; ZHANG, 2003; CHACANA et al., 2004; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; CHALGHOUMI et al., 2009).

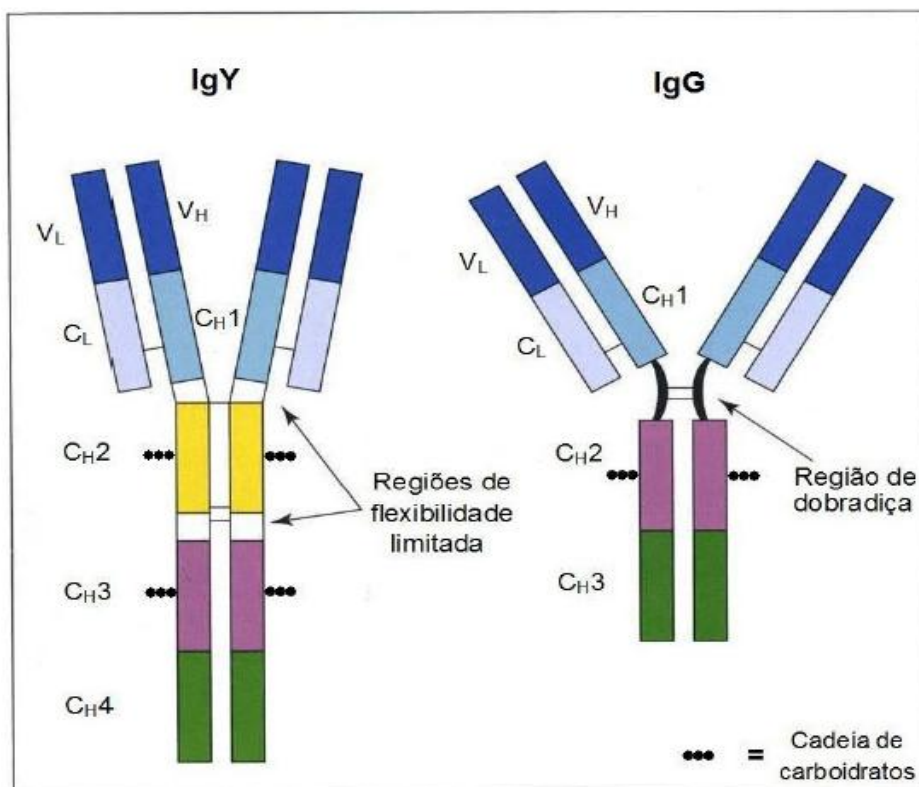
A molécula de IgY é menos flexível comparada à de IgG, devido à ausência da região de dobradiça (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Na cadeia pesada da IgG, os domínios C_{H1} e o C_{H2} são separados pela região de dobradiça, que dá considerável flexibilidade ao fragmento Fab (porção com atividade de ligação ao antígeno). Em contraste, a cadeia pesada da IgY não tem a região de dobradiça, porém possui resíduos de prolina e glicina nas regiões entre os domínios C_{H1} - C_{H2} e C_{H2} - C_{H3} . Essas regiões

têm o potencial de conferir certa flexibilidade à molécula (CHALGHOUMI et al., 2009).

Comparações das sequências dos domínios na IgG e na IgY têm mostrado que os domínios C_{H2} e C_{H3} da IgG são equivalentes aos domínios C_{H3} e C_{H4} da IgY, respectivamente. O equivalente do domínio C_{H2} da IgY não existe na cadeia pesada da IgG (CHALGHOUMI et al., 2009).

Como na IgG, a porção Fc da IgY é a região com funções biológicas efetoras. Esta contém dois carboidratos lateralmente às cadeias, em contraste com a IgG, que possui somente um carboidrato (SCHADE et al., 2005; CHALGHOUMI et al., 2009).

Figura 1 – Representação esquemática da IgY de aves e IgG de mamíferos (VASCONCELOS, 2010 adaptado de WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995).



REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, I. S.; et al. Experimental studies on brucellosis in chickens. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON BRUCELLOSIS, 3. **Developments in Biological Standardization**. Algiers: Algeria, v. 56, p. 711-718, 1984.
- ABDU, P. A.; ADESIYUN, A. A.; ABDULLAHI, S.U.. Serological evidence of brucellosis, Q-fever, Salmonellosis and Mycoplasmosis in chicken from nomadic herds around Zaria. **Nigerian Veterinary Journal**, Zaria, v. 13, p. 61-62, 1984.
- ALTON, G.G.; et al. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**, First Edition, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris: France, 192 p., 1988.
- ALVES, A. J. S.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 6-13, Nov. 2009.
- ANGUS, R. D.; BROWN, G. M.; GUE, C. S.. Avian Brucellosis: A case report of natural transmission from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, n. 10, p. 1609-1612, Out. 1971.
- ARAÚJO, A. S. **Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- AZEVEDO, S. S.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 19-26, Nov. 2009.
- BOSCHIROLI, M. L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. **Current Opinion in Microbiology**, Nimes, France, v. 4, n. 1, p. 58-64, Fev. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**: legislação. Brasília, DF, 2006, 188p.
- BRUCE, D.. Note on the Discovery of a micro-organism in Malta Ferver. **Practitioner**, Fort Worth, USA, v. 39, p. 161-170, 1887.

BUDDLE, M. B.; BOYES, B. W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 29, n. 6, p. 145-153, 1953.

BURNS, R. B.; MAXWELL, M. H. Probable occurrence of IgE in the adult domestic fowl (*Gallus domesticus*) after horse serum stimulation. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.5, n.1, p.67-72, Set., 1981.

CARLANDER, D.; et al. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies. **Egg Nutrition and Biotechnology** (Ed JS Sim), CAB International, Wallingford, Oxon, UK, Book, p.371-374, 1999.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody: in vitro and in vivo**. 2002. 53f. Tese (Doutorado em Química Clínica) – Faculdade de Medicina, Uppsala University, Suécia, 2002.

CARMICHAEL, L. E.; BRUNER, D. W. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **Cornell Veterinarian**, v. 58, n. 4, p. 579-592, 1968.

CARMICHAEL, L.E., *Brucella canis*, in: NIELSEN K., DUNCAN J.R. (Eds.), **Animal brucellosis**, Boca Raton: CRC Press, p. 335-350, 1990.

CASTRO, H. A.; GONSALEZ, S. R.; PRAT, M. I. Brucelosis: una revisión práctica. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, Buenos Aires, v. 39, n.2, p.203-216, 2005.

CHACANA, P.A.; et al. Tecnologia IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v.85, n.5, p.179-189, 2004.

CHALGHOUMI, R.; et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Belgium, v.13, n.2, p.295-308, 2009.

CHATE, S. C.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 46-55, Nov. 2009.

CHEN, C. L.; LEHMEYER, J. E.; COOPER, M. D. Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.129, n.6, p. 2580-2585, Dez. 1982.

COOK, M. E.; TROTT, D. L. IgY-immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. **World's Poultry Science**, Ithaca, v.66, n.2, p.215-226, Jul., 2010.

CORBEL, M.J.; BRINLEY-MORGAN, W.J.. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL, in: Krieg N.R., Holt J.G. (Eds.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., v. 1, p. 377– 388, 1984.

CORBEL, M. J.; STUART, F. A.; BREWER, R. A.. Observations on serological cross-reaction between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. **Developments in Biological Standardization**, v. 56, p. 341-348, 1984.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 1., Jerusalem, Israel. **Resumos**. Jerusalem, v.3, n.2, p.213-221, 1997.

CORBEL, M.J.. World Health Organization., Food and Agriculture Organization of the United Nations., and International Office of Epizootics. (2006). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: World Health Organization, 2006. 89 p.

CRAIG, C. F.: Malta Fever. Its occurrence in the United States Army, with a review of the literature. **The American Journal of the Medical Sciences**, San Francisco, v. 125, n. 1, p. 105-115, January 1903.

DAVIS, C.; REEVES, R. **High Value Opportunities From The Chicken Egg**. Kingston: Rural industries research and development corporation, 2002, 61p.

DIAS, J. A.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 66-76, Nov. 2009.

DIAS, R. A.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 118-125, Nov. 2009.

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

ESTEIN, S. M. Immunological aspects in the diagnosis and control of contagious epidymitis of rams by *Brucella ovis*. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v.31, n.1, p.1- 18, 1999.

EYRE, J. W. **Melitensis septicaemia (Malta or Mediterranean fever)**. *Lancet*, v. 1, p. 1677-1682, 1908.

FOSTER, G.; et al. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. **Veterinary Record**, v. 138, n. 24, p. 583-586, 1996.

FOSTER, G.; et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reino Unido, v.57, n.11, p.2688-2693, 2007.

GASSMANN, M.; et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.4, n.8, p.2528-2532, Maio 1990.

GONÇALVES, V. S. P.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 14-18, Nov. 2009.

GONÇALVES, V. S. P.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 35-45, Nov. 2009.

GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G., GAMA FILHO, R. V. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas on line**, Espírito Santo, v. 2, n. 7, 2008.

GUGONG, V. T.; et al. Serological Evidence of Brucellosis in Local Chickens in Kaduna State, Nigeria. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Nigeria, v.11, n. 3, p. 418-420, 2012.

HÄDGE, D.; AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins. IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursor of mammalian IgA. **Molecular Immunology**, Elmsford, v.85, n.8, p.96-99, 1984.

ISHIZUKA, M. M.. **Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina**. São Paulo: Masaio Assessoria Científica, 2003, 30p.

JUNAIDU, A. U.; et al. Brucellosis in Local Chickens in North Western Nigeria. **International Journal of Poultry Science**, Nigeria, v. 5, n. 6, p. 547-549, 2006.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H. LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science**, Ithaca, v.50, n.3, p.341-348, 2004.

KLEMPERER, F.. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1893; 31, 356-382 apud NARAT, M.. Production of antibodies in chickens. **Food Technology and Biotechnology**; Domzale, v. 41, n. 3, p. 259-267, 2003.

KLEMPERER, F.. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1893; 31, 356-382 apud TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.131, n.3., p.569-574, 2002.

KLEIN-GUNNEWIEK, M. F. C.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 77-84, Nov. 2009.

KUMAR, S.; et al. Brucellosis in poultry – Na experimental study. **Internacional Journal of Zoonoses**, Taiwan, v. 11, n. 2, p. 133-138, Dec. 1984.

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

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v.1130, n.6, 1337-1352, 1969.

- MANTUR, B. G.; AMARNATH, S. K.; SHINDE, R. S.. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Belgaum, v. 25, n. 3, p. 188-202, 2007.
- MARQUES, D. C.. **Criação de bovinos: brucelose bovina**. Belo Horizonte: Editora CVP Consultoria Veterinária e Publicações, 7 ed., 2003, 586p.
- MARVULO, M. F. V.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 93-102, Nov. 2009.
- MARSTON, J. A. Report on fever (Malta). **Report of the Army Medical Department**, Great Britain, v. 3, p. 486-498, 1861.
- MATHIAS L. A.; MEIRELLES R. B.; BUCHALA F.. Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p. 18 -22, 2007.
- MOLNÁR, L.; et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Belém, v. 22, n. 2, p. 41-44, 2002.
- MOORE, C. G.; SCHNURRENBERGER, P. R. A review of naturally ocuring *Brucella abortus* infections in wild mammals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Pittsburgh, v. 179, p. 1105-1112, 1981.
- MORRISON, S. L.; et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, Los Angeles, v.38, n.8, p.619-625, 2002.
- NEGREIROS, R. L.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 56-65, Nov. 2009.
- NICOLETTI, P.. Vaccination, In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. (Eds.), **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 283-299 (Chapter 11), 1990.
- OCHOLI, R.A.; et al. Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. **Revue Scientifique Technique off International Epizooties**, Nigeria, v. 24, n.3, p. 973-979, 2005.

OGATA, R. A.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 126-134, Nov. 2009.

OIE. **OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**. Paris: 12 Rue de Prony, 4 ed., 2000.

PACHECO, G.; MELLO, M. T. **Brucelose**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 727 p., 1956.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 105-112, Jun. 2002.

PAULIN, L. M. Artigo de revisão: Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.239-249, Abr./Jun. 2003.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: Situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154p.

PAULY, D.; et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in hens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, Champaign, v.88, n.2, p.281–290, 2009.

POESTER, F. P. Centro de Controle de Zoonoses e Vetores. Prefeitura Municipal de Curitiba. 2009. **Manual de Zoonoses: Leptospirose**. Disponível em: www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivoszoonoses_leptospirose Acesso em: 15 janeiro 2013.

POESTER, F.; et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 1-5, Nov. 2009.

RICKEY, E. J.; HARRELL, C. D. **Brucella abortus Disease (Brucellosis) in Beef Cattle**. Document, VM- 100 of a series of the Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1997. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VM/VM02600.pdf>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

RIET-CORREA F.; et al. **Doenças de ruminantes e equinos**. Editora Varela. II: São Paulo, São Paulo, 2001, 574p.

ROCHA, W. V.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 27-34, Nov. 2009.

ROSE, M. E.; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. **European Journal of Immunology**, Baltimore, v.4, n.7, p.521-523, Jul., 1974.

ROSS, H. M.; et al. *Brucella* species infection in sea mammals. **Veterinary Record**, Weybridge, v. 134, n. 14, p. 359, 1994.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M.. Pathogenesis of abortion in bovine brucellosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Buenos Aires, v. 16, n.2, p. 95-101, Abr. 1993.

SAMARTINO L. E.; et al. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhoo vaccination with strain 19 in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, Buenos Aires, v. 45, n. 3-4, 193-199, 2000.

SANGARI, F.; AGÜERO, J.. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. **Microbiologia**, Santander, v. 12, n. 2, p. 207–218, 1996.

SCHADE, R.; et al. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk-an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. **Alternative to Laboratory Animal: ATLA**, Nottingham, v.19, p.403-419, 1991.

SCHADE, R.; et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY - The report and recommendations of ECVAM workshop 21. **Alternative to Laboratory Animal: ATLA**, Nottingham, v.24, p.925-934, 1996.

SCHADE, R.; et al. **Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY technology**. Heidelberg: Springer, 2001. 255p.

SCHADE, R.; et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative to Laboratory Animals: ATLA**, Berlin, v. 2, n. 33, p. 129-154, 2005.

SCHMIDT, P.; et al. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal disorders. **Veterinary Medicine**, München, v. 86, n.8, p. 619-628, Oct. 1989.

SCHOLZ, H.C.; et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Internatonal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Munich, v.58, n. 2, p.375-382, Fev. 2008.

SCHURIG, G. G.; et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, Blacksburg, v.28, n. 2, p.171-188, Jul. 1991.

SHARMA, J.M. 2003. The Avian Immune System. In 11th Edition. **Diseases of Poultry**. In: SAIF, Y. M.; et al. Ames: State University Press, p. 5-16.

SHIMIZU, M.; et al. Molecular Stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.56, n.2, p.270-274, 1992.

SIKUSAWA, S.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 103-108, Nov. 2009.

SILVA, V. G. S. O.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 109-117, Nov. 2009.

SPINK, W. W.. **The nature of brucellosis**. Minneapolis: University of Minnesota Press., 1956, 464p.

STONNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. **American journal of veterinary research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, 1957.

TESAR, D. B.; CHEUNG, E. J.; BJORKMAN, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.19, n.4, p.1587–1593, 2008.

TINI, M.; et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.131, n.3., p.569-574, 2002.

VASCONCELOS, G. A. L. B. M.. **Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado.** 2010. 121 f. Dissertação (Pós-graduação em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2010.

VILLAR, K. S.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 85-92, Nov. 2009.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, Charleston, v.16, n.8, p.392-398. 1995.

WHO. World organization for animal health. **Bovine Brucellosis**. Em: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), v. 2 (Chapter 2.4.3), USA, p. 15, 2009.

YOUNG J. E. An overview of humam brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Texas, v. 21, n. 2, p. 283-290, Ago. 1995.

ZAMMIT, T. **Report of the Commission on Mediterranean Fever**, part III. London: Harrison and Sons, p. 83, 1905.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v.8, n.8, p.364-371, 2003.

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

RESUMO - Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta imune humoral em aves imunizadas com a Vacina B19 e com o extrato proteico solúvel (EPS) extraído da vacina através da produção de anticorpos policlonais específicos, detectáveis em testes ELISA indireto. Foram imunizadas seis galinhas com 25 semanas de idade, da raça *White Leghorn*, sendo duas imunizadas com a vacina B19 (cepa B19 de *Brucella abortus*), duas com um extrato proteico solúvel extraído da vacina B19 e duas formando o grupo controle, imunizadas com tampão de diluição do antígeno (PBS) mais adjuvante. Coletas de sangue foram realizadas quinzenalmente e de ovos diariamente, durante 13 semanas. A IgY foi purificada a partir da gema dos ovos, utilizando para a delipidação o método de diluição em água ácida e a precipitação com sulfato de amônio. Realizou-se os testes AAT, 2-ME e ELISA indireto para verificar a especificidade da IgY, nestes foi possível observar a produção de anticorpos policlonais específicos aos antígenos utilizados, tanto no soro quanto nas gemas purificadas. A produção de anticorpos foi maior no grupo de galinhas imunizadas com a vacina B19 do que no grupo imunizado com o antígeno EPS. Conclui-se então que galinhas imunizadas com a vacina B19 e com EPS de *Brucella abortus* produziram anticorpos reativos a cada um desses antígenos detectáveis no ELISA indireto. Além disso, o EPS mostrou ser um potencial antígeno para ser utilizado em testes diagnósticos e produção de vacinas.

Palavras-chave: Vacina B19. Extrato proteico solúvel. Galinhas.

CHAPTER 2 - PRODUCTION AND PURIFICATION OF POLYCLONAL Y IMMUNOGLOBULIN FOR DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the humoral immune response in birds immunized with the vaccine B19 and soluble protein extract (SPE) extracted from the vaccine by producing specific polyclonal antibodies, detectable in ELISA tests. Six chickens with 25-week-old, White Leghorn breed, were immunized, two immunized with B19 (B19 strain of *Brucella abortus*), two with a EPS extracted from B19 vaccine and two forming the control group immunized with buffer dilution of antigen (PBS) plus adjuvant. Blood samples were taken fortnightly and eggs daily for 13 weeks. The IgY was purified from egg yolk using for delipidation the dilution method in acidic water and precipitation with ammonium sulfate. We carried out tests AAT, 2-ME and ELISA to verify the specificity of IgY, in these it was possible to observe the production of specific polyclonal antibodies to the antigens used in both serum and in the purified yolk. Antibody production was higher in the group of chickens immunized with B19 vaccine than in the group immunized with the antigen EPS. It follows then that chickens immunized with B19 vaccine and with EPS of *Brucella abortus* produced antibodies reactive to each of these antigens detectable in indirect ELISA. In addition, the EPS proved to be a potential antigen for use in diagnostic tests and vaccine production.

Keywords: Vaccine B19. Soluble protein extract. Chickens.

2.1 INTRODUÇÃO

Os anticorpos específicos, policlonais ou monoclonais, atualmente disponíveis para pesquisa, diagnóstico e terapias são obtidos principalmente de mamíferos, entre eles coelhos e camundongos, respectivamente (NARAT, 2003).

De maneira alternativa, os anticorpos purificados da gema de ovos de galinhas imunizadas, denominados imunoglobulinas Y ou IgY (do inglês *yolk* = gema), tem se mostrado úteis em várias aplicações, entre elas imunodiagnóstico, imunoterapia e estudos de proteômica, além de ser uma ferramenta para a purificação ou detecção de antígenos e como um agente de proteção na imunização passiva (NARAT, 2003; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

Em relação à tecnologia convencional de produção da IgG, existem diversas características que tornam vantajosa a utilização da IgY como imunobiológico, entre elas estão o bem-estar animal e a viabilidade econômica.

Uma grande vantagem de trabalhar com anticorpos presentes na gema de ovos de galinhas está relacionada ao bem-estar animal. Em se tratando de conceitos de “reduzir, substituir e refinar”, muito discutido pelas comissões de ética em pesquisas com animais, a tecnologia IgY favorece a redução das manipulações dolorosas dos animais, visto que a coleta de ovos é um método simples, não invasivo e reduz o número de animais utilizados na produção de anticorpos (GOTTSTEIN; HEMMELER, 1985; SCHADE et al., 1996; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

Além disso, a utilização de galinhas como produtoras de anticorpos policlonais é economicamente mais interessante que a utilização de mamíferos para o mesmo fim. O manejo de galinhas é considerado simples e relativamente barato. Sistemas automatizados de alimentação diminuem custos, principalmente devido à redução do número de trabalhadores necessários. Além de produzir IgY rapidamente e em grandes quantidades, as galinhas mantêm altos níveis de anticorpos por um longo período (POLSON; VON WECHMAR; VAN REGENMORTEL, 1980).

Entre outras vantagens na utilização do IgY está uma elevada quantidade de anticorpos purificados por mL de gema sem a sangria da galinha, o rendimento da IgY é muito superior ao rendimento da IgG obtida em mamíferos, variando conforme os protocolos de imunização e purificação empregados; e normalmente os métodos de extração de imunoglobulinas da gema são de baixo custo e de fácil execução (SCHADE et al., 1996; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

As IgY também são moléculas com elevada especificidade para a ligação e inativação de substâncias externas, tais como moléculas tóxicas ou antígenos, que são capazes de invadir o corpo (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que a IgY possui afinidade e sensibilidade similar à da IgG dos mamíferos (CHACANA et al., 2004).

Além disso, os anticorpos IgY evitam a ocorrência de resultados falso-positivos nas técnicas de imunoensaio que empregam amostras de soro ou células de mamíferos, pois não sofrem interferência do fator reumatóide; não fixam o complemento e não interagem com o receptor para Fc dos mamíferos. Em relação à purificação, os anticorpos IgY não se ligam às proteínas A e B de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., respectivamente (TINI et al., 2002; CARLANDER, 2002; ZHANG, 2003).

A distância filogenética entre galinhas e mamíferos torna possível a produção de anticorpos contra proteínas altamente conservadas de mamíferos (LARSSON CARLANDER; WILHELMSSON, 1998). Além disso, anticorpos de galinha reconhecem epítomos diferentes dos anticorpos de mamíferos, aumentando assim o número de anticorpos diferentes e consequentemente a possibilidade de ligação (CARLANDER et al., 1999).

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser influenciado pela presença de reações cruzadas que geram resultados sorológicos falso-positivos devido ao fato de outras bactérias Gram-negativas partilharem determinantes antigênicos semelhantes à cadeia de polissacarídeo O da *Brucella abortus*. Alguns pesquisadores confirmaram a possibilidade de reação cruzada para outras doenças em testes sorológicos (WEYNANTS et al., 1996; NIELSEN et al., 2006; AL DAHOUK et al., 2006).

As evidências de reações imunológicas cruzadas entre as cepas lisas das *Brucella* sp. com outros micro-organismos são diversas. Já foi descrito que as bactérias *Yersinia enterocolitica* “O:9”, *Escherichia coli* “O157:H7”, *Salmonella* sp., *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae* podem reagir nos testes sorológicos na detecção da brucelose bovina (MOLNÁR et al., 1997; KITTELBERGER et al., 1998; GODFROID et al., 2002; NIELSEN et al., 2004; AL DAHOUK et al., 2006).

Em outro estudo, Naves et al. (2012) constataram que bovinos recém-vacinados contra leptospirose reagem nos testes diagnósticos para brucelose em até 100 dias pós-vacinação, sugerindo uma provável reação cruzada nos testes diagnósticos de brucelose.

Além disso, a vacina B19, obrigatória pelo PNCEBT, por ser uma amostra lisa de *Brucella abortus*, induz a formação de anticorpos específicos contra o LPS e pode interferir no diagnóstico sorológico da brucelose (BRASIL, 2006).

Um dos pontos mais preocupantes no uso da vacina é a persistência de anticorpos sorológicos pós-vacinais, o que gera muitos resultados falso-positivos nas provas sorológicas hoje utilizadas, sendo difícil distinguir anticorpos de infecção, daqueles resultantes da vacinação (OMS, 1986; MEGID et al., 2000).

Os procedimentos sorológicos atualmente utilizados no diagnóstico de brucelose bovina baseiam-se na detecção de anticorpos anti-lipopolissacarídeo (LPS). Estes são incapazes diferenciar anticorpos de bovinos naturalmente infectados e bovinos vacinados (WRIGHT; NIELSEN, 1990).

Os testes realizados com o LPS ou extratos ricos em LPS levam a extensas reações cruzadas com outras bactérias gram-negativas (CORBEL; STUART; BREWER, 1984). Assim, a determinação de uma resposta humoral contra proteínas livres de LPS pode ajudar a evitar as indesejáveis reatividades (GOLDBAUM et al., 1993).

Um dos principais objetivos dos estudos imunológicos de brucelose tem sido a identificação de antígenos não-lipopolissacarídicos, o que poderia ser útil para contornar inconvenientes causados pelo antígeno LPS (CHAUDHURI et al., 2010).

Debbarh et al. (1996) realizaram uma pesquisa com teste de ELISA indireto utilizando como antígeno uma proteína citosolúvel parcialmente purificada (CP28) obtida a partir do Extrato Protéico Solúvel de *Brucella melitensis* cepa B115, e verificaram que este antígeno foi capaz de diferenciar a ovelhas naturalmente infectadas com *Brucella melitensis* de ovelhas vacinadas com Rev-1.

Diante da possibilidade de reações falso-positivas em testes diagnósticos oficiais para brucelose, da obrigatoriedade do sacrifício do animal sororreagente aos testes e da necessidade de se ter vacinas que não interfiram em testes diagnósticos e que apresentem uma boa imunidade protetora, tornam-se imprescindíveis pesquisas para o desenvolvimento de vacinas e de novos métodos diagnósticos.

Em virtude das desvantagens apresentadas pelos métodos atuais, o objetivo desse capítulo foi avaliar a resposta imune humoral de galinhas imunizadas com vacina B19 e extrato proteico solúvel extraído a partir da vacina, por meio da realização dos testes oficiais para brucelose (AAT e 2-ME) e da verificação de níveis de anticorpos IgY policlonais, em testes ELISA indireto.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em local destinado a experimentos em galinhas no Bloco 4C e nas dependências do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU). Todos os procedimentos realizados com as galinhas foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o número de registro CEUA/UFU 071/12.

2.2.1 Animais utilizados

Foram utilizadas seis galinhas poedeiras da linhagem *White Lenghorn*, de 25 semanas de idade. Elas foram mantidas em instalações adequadas para a experimentação animal, existente no Bloco 4C, Campus Umuarama, Universidade Federal de Uberlândia, com alimentação e água à vontade.

As galinhas foram divididas por gaiolas referentes aos grupos trabalhados, utilizando-se um total de 3 gaiolas, mantendo 2 galinhas em cada gaiola, como mostra Figura 1.

Figura 1: Local onde as galinhas eram mantidas durante o experimento.



2.2.2 Obtenção do antígeno

A vacina utilizada para imunização de um grupo de galinhas e obtenção do extrato proteico solúvel (EPS), foi Brucelina B19 (amostra lisa da cepa B19 de *Brucella abortus*), válida por 18 meses a partir da data de fabricação sob a forma liofilizada e conservada à temperatura de 2 a 8°C, produzida pelo laboratório Vallée, com nº de partida 011/12, fabricação em fevereiro/2012 e validade até agosto de/2013.

Para a extração do EPS de *Brucella abortus* utilizou-se a técnica de extração de proteínas, sendo a fração final obtida através da diálise por um sistema com uma membrana de 1 kDa, para concentrar as frações.

O processo de extração do EPS foi padronizado no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC-UFU), através de adaptações realizadas ao protocolo de extração de proteínas do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, 2007). Para realizar o procedimento de extração, após homogeneização, a vacina B19 foi dividida em microtubos de 2 mL, colocando-se 2mL em cada microtubo, e levados à centrifugação (Centrífuga Refrigerada Eppendorf 5804R) a 5.000 rpm por 8 minuto a 4°C. Após centrifugados, descartou-se o sobrenadante de cada microtubo, e o *pellet* foi ressuscitado em 300 µL de tampão de lise (50 mM NaCl / 200 mM Tris-NaCl pH 8.0 / 1% detergente Triton X-114) e 18 µL de PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil), que é um inibidor irreversível de proteases serinas, incluindo tripsina, quimiotripsina, e trombina. Após a adição do tampão de lise e inibidor de protease, a solução de cada microtubo foi homogeneizada e levada a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Todos os microtubos foram então centrifugados a 14000 x g por 1 hora a 4°C. Finalizado o processo de centrifugação, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante (extrato proteico solúvel – EPS) foi dialisado com em sistema de membrana de diálise de 1kDa, para filtração e concentração do EPS e estocado a -20°C até o uso.

A concentração proteica final do EPS foi avaliada pelo método de Bradford (1976), sendo sua leitura realizada a 595 nm, em espectrofotômetro Ultraspec-1000 (Pharmacia, Biotech®). A concentração da proteína obtida por esse método foi de 1,03 µg/µL.

Após extração do EPS, investigou-se o produto obtido dessa extração através da eletroforese unidimensional. Utilizou-se gel de poliacrilamida a 16% (p/v), aplicando-se diferentes quantidades de 30,9 µg (30 µL) e 41,2 µg (40 µL) de amostra por poço, além do EPS, também aplicou-se no gel amostras da vacina B19, com quantidades de 10 e 20 µL. A visualização das bandas proteicas foi feita através da coloração do gel com prata.

2.2.3 Imunização

As galinhas foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais (Tabela 1). O esquema de imunizações foi realizado de acordo com Barbas et al. (2001).

Tabela 1: Grupos experimentais e tipo de imunização utilizada.

Grupo	N	Imunização
1	2	PBS + Adjuvante*
2	2	Vacina B19 diluídas em PBS + Adjuvante*
3	2	Extrato Proteico Solúvel diluído em PBS + Adjuvante*

* Adjuvante de *Freund* (Sigma Chemical Co.)

As imunizações foram realizadas com intervalos de 15 dias; na primeira foi usado o adjuvante completo de Freund (Sigma), composto de uma emulsão de água em óleo adicionada de *Mycobacterium* sp., e nas seguintes, o adjuvante incompleto de Freund (Sigma), que não possui o *Mycobacterium* sp. em sua composição, correspondendo a 50% do volume total da solução. Administraram-se 500 µL (250 µL do antígeno diluído em PBS e 250 µL de adjuvante) profundamente no músculo peitoral da galinha (Figura 2), dividindo o volume total em quatro pontos diferentes, foi feito o acompanhamento para avaliação de reações pós-vacinais.

Figura 2: Imunização via intramuscular no músculo peitoral da galinha.



Todos os grupos foram imunizados seis vezes; os Grupos 1 e 2, foram inoculados com 250 μ L de PBS, e 250 μ L da Vacina B19 diluída em PBS, respectivamente. O Grupo 3 foi imunizado com 200 μ g de EPS diluído em 250 μ l de PBS, conforme Figura 3.

Foram realizadas sete coletas de sangue quinzenais (Figura 3), 1 mL na asa (veia ulnar) (Figura 4), com a primeira coleta 1 semana imunização e as demais realizadas 1 semana após cada inoculação.

Figura 3: Esquema de coleta de sangue e imunização de galinhas dos Grupos 1, 2 e 3.

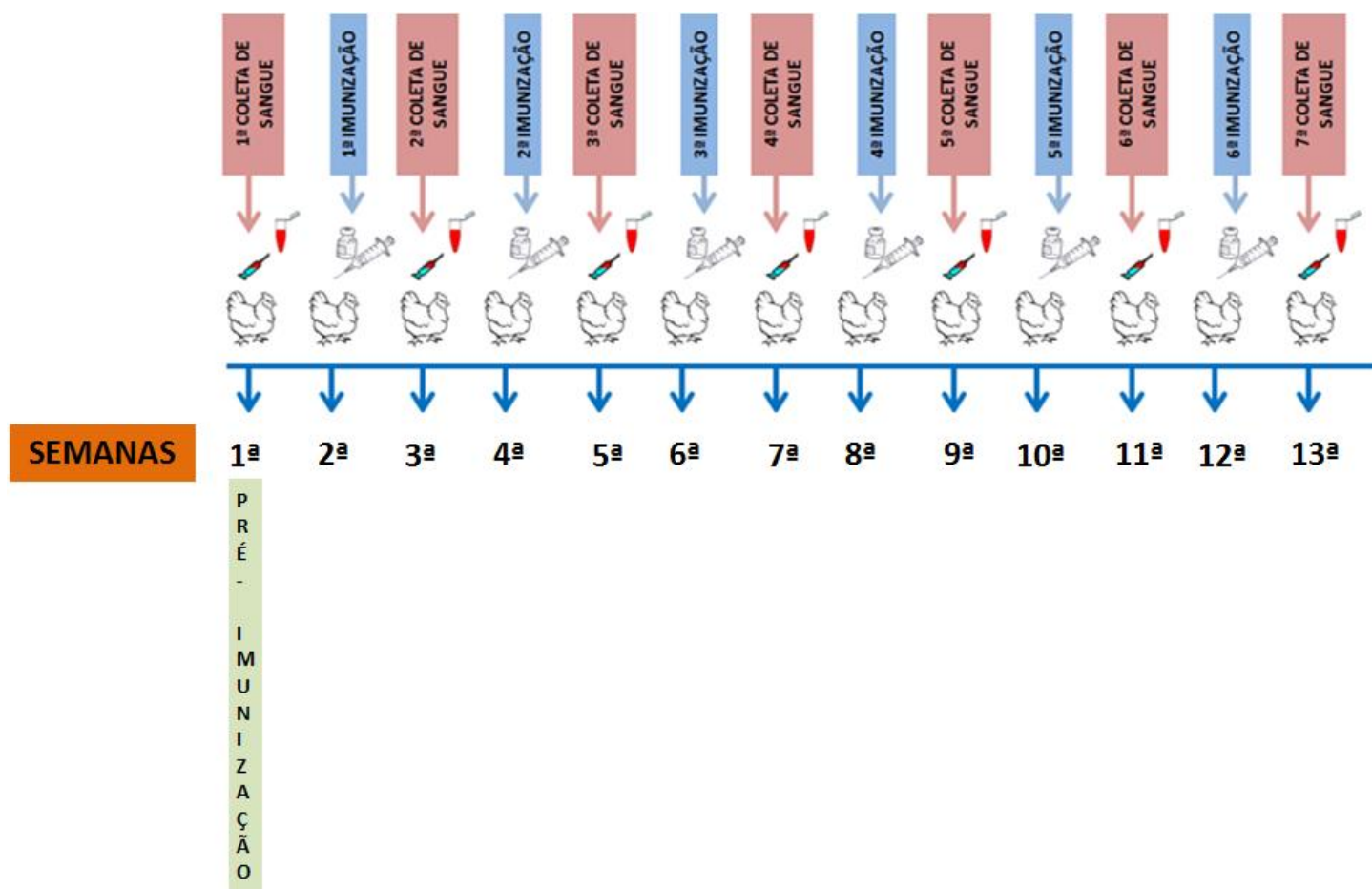


Figura 4: Coleta de sangue na asa de galinhas através da veia ulnar.



Os ovos foram coletados diariamente a partir de uma semana antes da inoculação (pré-inoculação). Após a coleta, os ovos foram separados por semana, e estocados a 4°C até a realização do processo de delipidação.

A primeira coleta de sangue e ovos, feita uma semana antes da primeira imunização (pré-inoculação), foi realizada para verificação de que as galinhas não estavam reagentes aos antígenos utilizados na imunização.

2.2.4 Extração e purificação de imunoglobulinas Y policlonais totais

As gemas dos ovos foram cuidadosamente separadas da clara e lavadas com água ultrapura para a remoção de resíduos de clara. Em seguida, a membrana vitelínica foi rompida e a gema foi coletada em frascos cônicos de 50 mL, os quais foram armazenados a -20°C até o momento da purificação. Ao final do procedimento, obteve-se um *pool* semanal de gemas para cada um dos três grupos de galinhas imunizadas.

Os processos de extração e purificação dos anticorpos IgY totais iniciaram-se pela delipidação, remoção da fração lipídica da gema, segundo Akita e Nakai (1993), com algumas adaptações. A gema pura foi diluída com água ultrapura na proporção 1:15 (v/v), após a homogeneização o pH da mistura foi ajustado para uma faixa entre 5,0-5,2, por meio de gotejamento de HCl 0,1 N e, em seguida, a mistura acidificada foi armazenada a 4°C *overnight*. Após esse período, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* contendo a fração rica em lipídeos foi descartado e o sobrenadante contendo os anticorpos totais foi filtrado (filtro de 0,45 µm Millipore e de 0,25 µm Millipore). A amostra filtrada teve seu pH ajustado para 7,4 com PBS 10x e após isso foi armazenada a 4°C.

Após a delipidação, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio (Synth) com base no protocolo de Araújo et al. (2010). Adicionou-se sulfato à amostra filtrada na concentração de 20% (p/v) sob agitação durante 30 minutos a 4°C. Após esse tempo, o material foi centrifugado a 2.000 x g por 30 minutos a 4°C, com isso o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS 1x, pH 7,4.

Foi realizada a diálise do produto final das amostras em uma membrana de AMICOM (Amicom Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Millipore). A amostra, juntamente com PBS pH 7,4 foi centrifugada a 4.000 x g por 30 minutos em uma temperatura de 4°C, esse procedimento foi realizado três vezes.

Finalizado o processo da extração das imunoglobulinas Y totais, a concentração proteica foi obtida em todas as frações por meio do método de Bradford (1976) e a pureza das preparações foi investigada por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE). A média da dosagem proteica obtida foi de aproximadamente 18,5 µg/µL. Utilizou-se gel de poliacrilamida a 16% (p/v), aplicando-se 10µg de amostra por poço. A visualização das bandas proteicas foi feita através da coloração do gel com prata e *Coomassie Blue* R250 (Sigma).

Os processos de extração e purificação da IgY foram realizados apenas nas gemas dos ovos, não sendo realizados no soro sanguíneo das galinhas.

2.2.5 Sorologia das aves

Para avaliar a resposta imune humoral das galinhas imunizadas foram realizados os testes diagnósticos oficiais para brucelose segundo o PNCEBT, tais como, Antígeno Acidificado tamponado (AAT) e 2- Mercaptoetanol (2-ME); e o teste de ELISA indireto com os respectivos antígenos utilizados na inoculação para a os três grupos.

2.2.5.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

O AAT foi realizado de acordo com o Manual do PNCEBT, Brasil (2006).

Foram utilizadas para este teste amostras individuais de soro sanguíneo das galinhas dos três grupos imunizados, provenientes das 7 coletas realizadas, e amostras de *pool* semanal de IgY extraído da gema do ovo de cada um dos grupos, provenientes de coletas diária feitas durante 13 semanas.

O antígeno, utilizado no teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), consiste de suspensão celular inativada de *Brucella abortus* amostra 1119-3, corada com rosa de Bengala, 8,0% de volume celular em solução tampão, pH 3,65, padronizado por comparação com o antígeno de referência.

O teste AAT é qualitativo, sendo utilizado como teste de triagem. A leitura dos resultados revela a presença ou ausência de IgG1 através da aglutinações na placa. O pH acidificado da mistura soro-antígeno inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM, revelando a presença somente da imunoglobulina IgG1. A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a esta prova, porém podem ocorrer

alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19.

2.2.5.2 Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)

O teste 2-ME foi realizado de acordo com o Manual do PNCEBT, Brasil (2006). Utilizaram-se neste teste apenas amostras de *pool* semanal de IgY extraído da gema do ovo de cada um dos grupos, provenientes de coletas diária feitas durante 13 semanas. Não foi realizado o teste de 2-ME nas amostras de soro sanguíneo individuais das galinhas de cada grupo, por não haver soro suficiente para realização do teste.

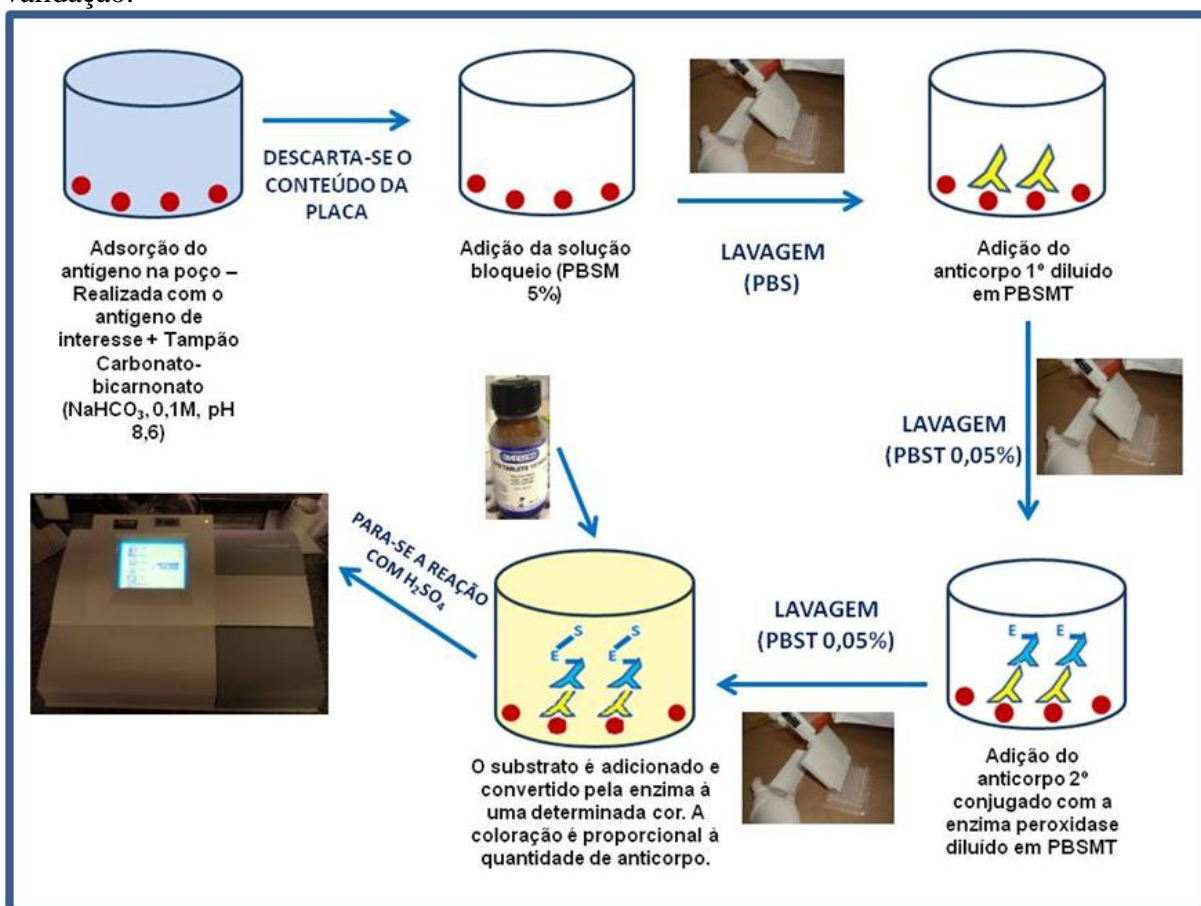
No teste 2-mercaptoetanol (2-ME), o antígeno utilizado apresenta concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 1119-3 de *Brucella abortus* inativada pelo calor, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

A prova do 2-mercaptoetanol (2-ME) fundamenta-se na ação de certos compostos que contêm o radical tiol, que degrada a configuração em pentâmero da IgM, quebrando as pontes dissulfeto da IgM, reduzindo-a a unidades monoméricas, determinando assim a perda de sua atividade aglutinante, tornando o teste sujeito apenas às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alteração na sua atividade, na presença desse reagente, aumentando a especificidade do teste (BERCOVICH, 1998). Este teste é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos.

2.2.5.3 ELISA indireto para confirmar a especificidade dos anticorpos IgY

Testes de ELISA indireto foram padronizados e validados conforme a Figura 5.

Figura 5: Esquema do protocolo do teste ELISA indireto utilizado na padronização e validação.



2.2.5.3.1 Padronização do ELISA indireto

Foram utilizadas quatro placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc), duas delas foram sensibilizadas com três concentrações diferentes de EPS, sendo 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$, e as outras duas foram sensibilizadas com três diluições diferentes da vacina B19, sendo 1:100, 1:500 e 1:1000. Os dois antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1 M, pH 8,6), colocados nas placas utilizando-se por poço um volume de 50 μL de acordo com as concentrações ou diluições mapeadas, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 μL /poço de tampão fosfato de sódio (PBS 0,01 M, pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C. Após bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS e adicionaram-se 50 μL do IgY previamente diluído em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e

leite desnatado a 5% (PBSTM), e depois as placas foram levadas a estufa a 37°C por uma hora. Nas placas sensibilizadas com a vacina B19 utilizou-se um *pool* de IgY B19 (10 µL de cada coleta ou semana) e um *pool* de IgY controle (10 µL de cada coleta ou semana) em quatro diluições diferentes, sendo 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, todas adicionadas em duplicata. Na placa sensibilizada com o EPS utilizou-se um *pool* de IgY EPS (10 µL de cada coleta ou semana) e um *pool* de IgY controle (10 µL de cada coleta ou semana) em quatro diluições diferentes, sendo 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, todas adicionadas em duplicata.

Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão fostato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 µL/poço do conjugado com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com peroxidase (Sigma) nas diluições de 1:5000 e 1:10000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio. Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa, que foi mantida sem a exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL) efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

A padronização foi realizada tanto para os anticorpos IgY do soro sanguíneo de galinha como para anticorpos IgY extraídos da gema do ovo das galinhas imunizadas, conforme Figuras 6 e 7.

O teste de ELISA indireto foi padronizado de acordo com Wright et al. (1993) e Madruga, Araújo e Soares (2001).

As concentrações e diluições ideais foram as que apresentaram a maior diferença em densidade óptica (DO) entre amostras de soro positivas (IgY B19 ou IgY EPS) e negativas (controle).

Figura 6: Esquema do protocolo utilizado na padronização do ELISA indireto para a placa sensibilizada com EPS.

PLACA 1 - SENSIBILIZADA COM EPS NAS CONCENTRAÇÕES DE 5ug / 10ug / 15ug													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AC 2 ^a 1/5000	A	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)
	B	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)
	C	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)
	D	POOL IgY EPS (1/800)	POOL IgY EPS (1/800)	BRANCO		POOL IgY EPS (1/800)	POOL IgY EPS (1/800)	BRANCO		POOL IgY EPS (1/800)	POOL IgY EPS (1/800)	BRANCO	
AC 2 ^a 1/10000	E	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY EPS (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)
	F	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY EPS (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)
	G	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY EPS (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)
	H	POOL IgY EPS (1/800)	POOL IgY EPS (1/800)	BRANCO		POOL IgY EPS (1/800)	POOL IgY EPS (1/800)	BRANCO		POOL IgY EPS (1/800)	POOL IgY EPS (1/800)	BRANCO	
		Ac primário - Pool de IgY do ovo de cada semana (10ul de cada semana) / Ag EPS 5ug				Ac primário - Pool de IgY do ovo de cada semana (10ul de cada semana) / Ag EPS 10ug				Ac primário - Pool de IgY do ovo de cada semana (10ul de cada semana) / Ag EPS 15ug			

Figura 7: Esquema do protocolo utilizado na padronização do ELISA indireto para a placa sensibilizada com B19.

PLACA 1 - SENSIBILIZADA COM B19 NAS DILUIÇÕES DE 1/100 / 1/500 / 1/1000													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AC 2 ^a 1/5000	A	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)
	B	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)
	C	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)
	D	POOL IgY B19 (1/800)	POOL IgY B19 (1/800)	BRANCO		POOL IgY B19 (1/800)	POOL IgY B19 (1/800)	BRANCO		POOL IgY B19 (1/800)	POOL IgY B19 (1/800)	BRANCO	
AC 2 ^a 1/10000	E	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY B19 (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)	POOL IgY CONTROLE (1/100)
	F	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY B19 (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)	POOL IgY CONTROLE (1/200)
	G	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY B19 (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)	POOL IgY CONTROLE (1/400)
	H	POOL IgY B19 (1/800)	POOL IgY B19 (1/800)	BRANCO		POOL IgY B19 (1/800)	POOL IgY B19 (1/800)	BRANCO		POOL IgY B19 (1/800)	POOL IgY B19 (1/800)	BRANCO	
		Ac primário - Pool de IgY do ovo de cada semana (10ul de cada semana) / Ag B19 1/100				Ac primário - Pool de IgY do ovo de cada semana (10ul de cada semana) / Ag B19 1/500				Ac primário - Pool de IgY do ovo de cada semana (10ul de cada semana) / Ag B19 1/1000			

2.2.5.3.2 Validação do ELISA indireto

Quatro placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço, sendo duas delas sensibilizadas com EPS na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, pH8,6) e duas com vacina B19 na diluição de 1:100, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas. No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 µL/poço de Tampão fosfato de sódio (PBS 0,01 M pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C. Após incubação foi realizado um ciclo de três lavagens com tampão PBS.

Após incubação com bloqueio e lavagens, foram adicionadas as placas 50 µL/poço de anticorpos primários na diluição de 1:100, previamente diluídos em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e leite desnatado a 5% (PBSTM) e as mesmas foram levadas à estufa a 37°C por uma hora. Em uma das placas sensibilizadas com EPS, os anticorpos primários utilizados foram um *pool*/coleta (7 coletas) de IgY proveniente do soro sanguíneo de galinhas imunizadas com EPS e galinhas do grupo controle, e na outra os anticorpos utilizados foram um *pool*/semana (13 semanas) de IgY proveniente da gema do ovo de galinhas imunizadas com EPS e galinhas do grupo controle. Em uma das placas sensibilizadas com B19, os anticorpos primários utilizados foram um *pool*/coleta (7 coletas) de IgY proveniente do soro sanguíneo de galinhas imunizadas com vacina B19 e galinhas do grupo controle, e na outra os anticorpos utilizados foram um *pool*/semana (13 semanas) de IgY proveniente da gema do ovo de galinhas imunizadas com vacina B19 e galinhas do grupo controle.

Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 µL/poço do conjugado com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com peroxidase (Sigma) nas diluições de 1:5000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15 mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio. Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa, que foi mantida sem exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com

ácido sulfúrico 4N (25 μ L), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

Os valores de absorbância obtidos foram registrados e em seguida utilizados para análise dos níveis de anticorpos.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta imune humoral de bovinos perante a imunização com a vacina B19 já é bastante conhecida, porém ainda não se conhecia esta resposta em aves. No caso do EPS extraído a partir da vacina B19, não é conhecida nenhuma resposta imune humoral perante esse antígeno, tanto em aves como em bovinos.

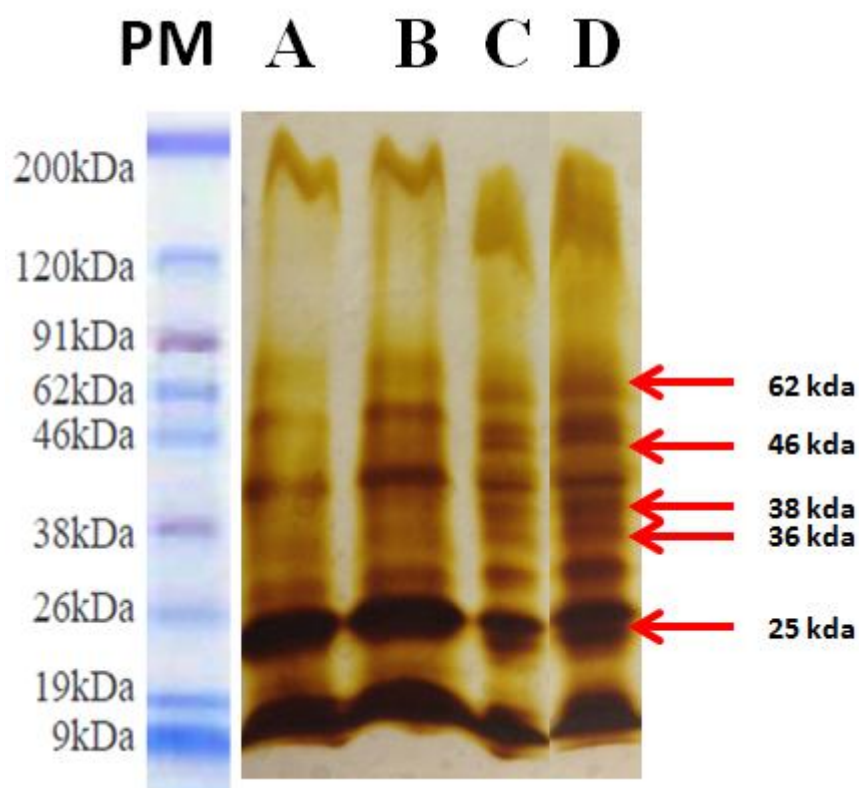
Tanto o antígeno vacina B19 como o antígeno EPS foram avaliados quanto à resposta imune humoral causada nas aves, na tentativa de obter anticorpos IgY como ferramentas em novos diagnósticos. Porém, o antígeno EPS ainda é pouco conhecido, visto que se padronizou neste estudo o seu processo de extração, contudo, além de possíveis ferramentas em diagnósticos pela resposta gerada em aves através dos anticorpos IgY, as galinhas foram alvo para teste de um novo antígeno, o EPS, ainda não conhecido, podendo este ser utilizado como imunógeno vacinal futuramente em bovinos, dependendo da resposta desenvolvida por ele nesse estudo.

Para conhecer a resposta das aves a este antígeno, primeiramente se fez necessário o conhecimento da estrutura deste antígeno a partir da comparação com a cepa da qual foi extraído. Para tanto, foi avaliada em gel eletroforese a sua estrutura para posterior conhecimento da resposta imune humoral gerada em aves.

A eletroforese do EPS extraído da vacina B19 demonstrou, na Figura 8, duas bandas proteicas mais fortemente marcadas no gel de poliacrilamida, de aproximadamente 14 kDa e 26 kDa, tanto no extrato proteico extraído como na vacina B19.

Esta figura também demonstra que houve perda de algumas proteínas quando comparou-se com a bandas proteicas presentes na vacina. Observa-se que, após o processo de extração do EPS, proteínas de peso molecular médio de aproximadamente 25 kDa, 36 kDa, 38 kDa, 46 kDa e 62 kDa, foram perdidas na extração.

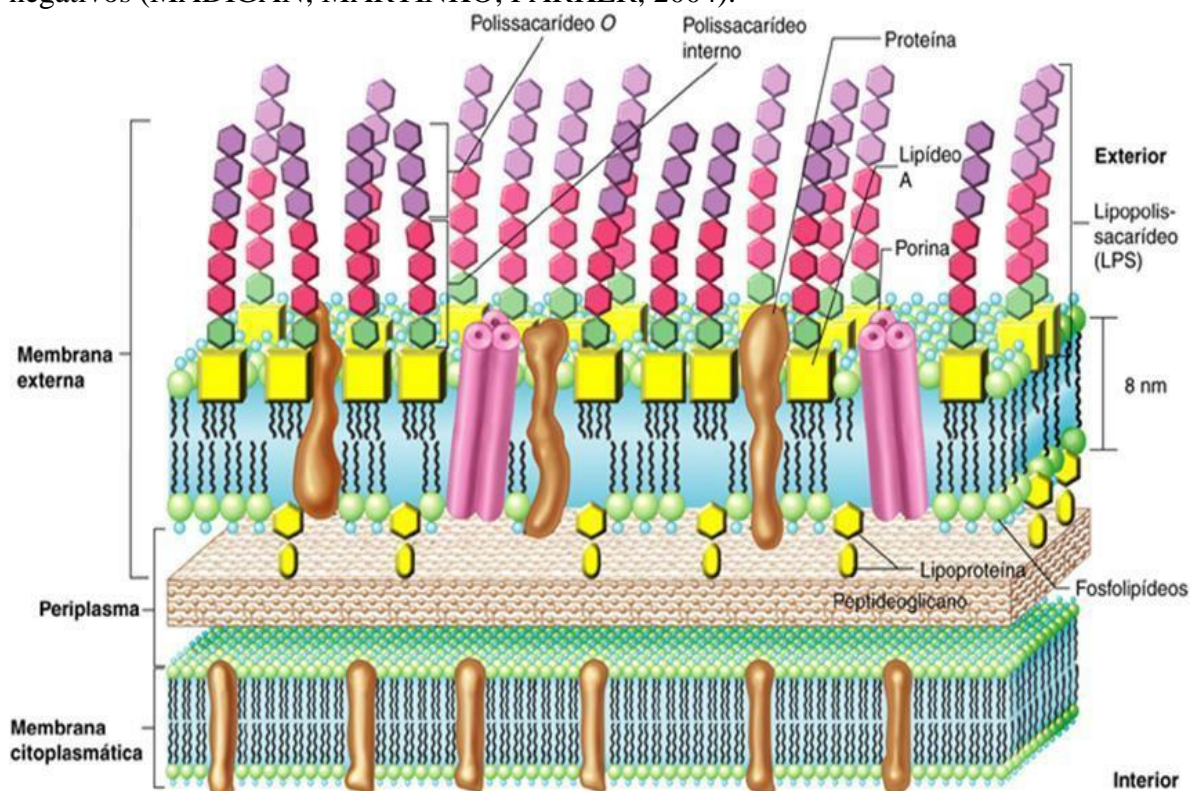
Figura 8: Perfil eletroforético do Extrato Proteico Solúvel de *Brucella abortus* (EPS) e da vacina B19.



Lengenda: PM - Padrão de peso molecular (Amresco), A - 30μL de EPS, B - 40μL de EPS, C - 10μL Vacina B19, e D - Vacina B19 20 μL.

A parede celular da brucela é uma estrutura de três camadas na qual há uma membrana interna ou citoplasmática, um espaço periplasmático e uma membrana externa que podem ser diferenciadas, conforme a Figura 9 (DUBRAY; PLOMMET, 1976; CLOECKAERT et al., 1990).

Figura 9: Representação esquemática da parede celular de micro-organismos Gram-negativos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).



Esta parede consiste de uma camada de peptidoglicano fortemente associada com a membrana exterior. A membrana externa contém lipopolissacáridos (LPS), proteínas e fosfolípidos, também observados na Figura 9 (DUBRAY; BEZARD, 1980; VERSTRAETE et al., 1982; MORIYON; BERMAN, 1983).

A membrana externa da *Brucella abortus* é composta por quatro componentes principais: LPS, polipeptídeos de 43 kDa e 36-37-38 kDa, e glicopeptídeos de 25-26-27 kDa (DUBRAY; CHARRIAULT, 1983).

As principais Proteínas de Membrana Externa (PME) de brucela são o grupo 2 das proteínas porina (MORIYON; BERMAN, 1983; DOUGLAS et al., 1984; SANTOS et al., 1984; VERSTRAETE; WINTER, 1984), também classificadas de proteínas de 36 a 38 kDa (DUBRAY; CHARRIAULT, 1983), grupo 3, também classificadas de proteínas de 25 a 27 kDa, e uma lipoproteína covalentemente ligada ao peptidoglicano (GOMEZ-MIGUEL; MORIYON, 1986). Grupo 1 proteínas pequenas têm uma massa molecular de 88-94 kDa (VERSTRAETE et al., 1982; VERSTRAETE; WINTER, 1984).

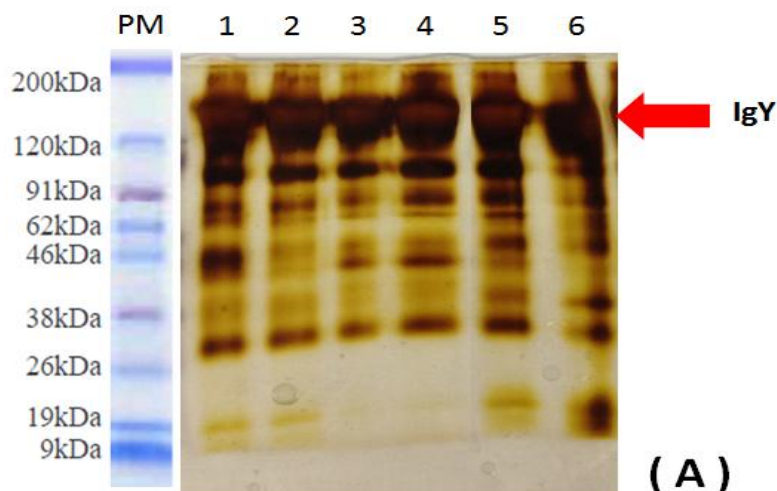
As PMEs podem ser extraídas da célula da brucela pelos métodos de Zwittergent ou dodecil sulfato de sódio (SDS), sem a utilização de lisozima (se as bactérias não tiverem sido inativadas antes da extração) ou com lisozima (se as células tiverem sido inativadas por calor ou por formalina) (DUBRAY; BEZARD, 1980; VERSTRAETE et al., 1982; MORIYON; BERMAN, 1983).

De acordo com os dados apresentados, as proteínas de 25 kDa, 36 kDa e 38 kDa, que foram perdidas no processo de extração do EPS pertencem aos grupos 2 e 3 das PMEs, que são importantes imunógenos na maioria das bactérias Gram-negativa (TIBOR; DECELLE; LETESSON, 1999; CLOECKAERT; ZYGMUT; GUILLOTEAU, 2002). Isso provavelmente se deve à diferença nos processos de extração, em que se utilizou um protocolo diferente dos aplicados nesses trabalhos.

A coloração de prata é um método altamente sensível capaz de detectar uma quantidade tão baixa como 1 ng de LPS, e é rotineiramente utilizada para visualização de banda padrão de LPS purificado (REZANIA et al., 2011). Portanto a banda de aproximadamente 14 kDa, mais fortemente marcada no gel, pode representar a cadeia O do LPS, de acordo com Aragon et al. (1996) e Lin e Nielsen (1997), que encontraram um peso molecular de 13,2 kDa para a cadeia O do LPS de *Brucella abortus*.

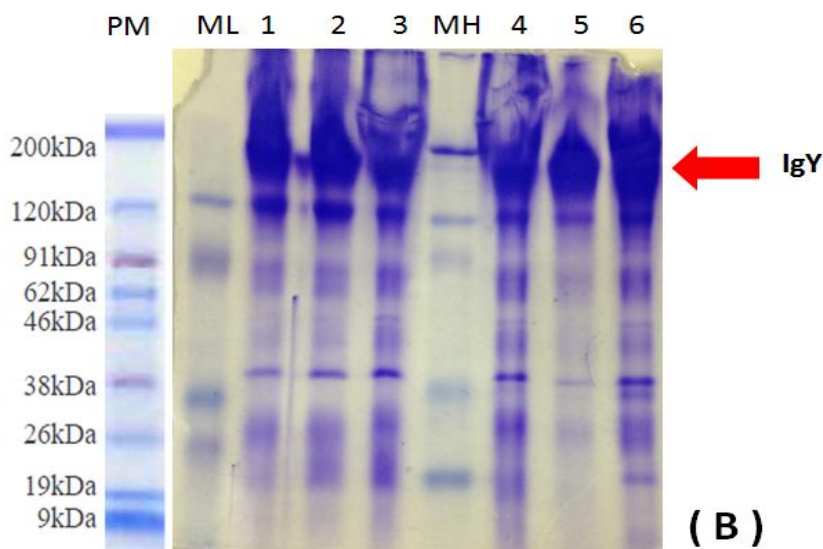
A eletroforese da IgY purificada das gemas de ovos (Figuras 10A e 10B) demonstrou que o processo de purificação com sulfato de amônio a 20% não foi eficiente, uma vez que no gel pode-se observar a formação de outras bandas proteicas além da de IgY.

Figura 10 A: Perfil eletroforético da IgY extraída da gema do ovo e purificadas com sulfato de amônio, com gel corado por coloração de prata.



Legenda: PM - Padrão de peso molecular (Amresco), 1 (10µg de IgY purificada 11ª semana Grupo Controle), 2 (10µg de IgY purificada 9ª semana Grupo B19), 3 (10µg de IgY purificada 10ª semana Grupo B19), 4 (10µg de IgY purificada 11ª semana Grupo B19), 5 (10µg de IgY purificada 11ª semana Grupo EPS) e 6 (10µg de IgY purificada 13ª semana Grupo EPS).

Figura 10 B: Perfil eletroforético da IgY extraída da gema do ovo e purificadas com sulfato de amônio, com gel corado por coloração *Coomassie Blue* R250 (Sigma).



Legenda: PM - Padrão de peso molecular (Amresco), ML (Marcador de proteína de baixo peso molecular- Amresco), 1 (10µg de IgY purificada 11ª semana Grupo Controle), 2 (10µg de IgY purificada 9ª semana Grupo B19), 3 (10µg de IgY purificada 10ª semana Grupo B19), MH (Marcador de proteína de alto peso molecular – Amresco), 4 (10µg de IgY purificada 11ª semana Grupo B19), 5 (10µg de IgY purificada 11ª semana Grupo EPS) e 6 (10µg de IgY purificada 13ª semana Grupo EPS).

Os métodos de purificação da IgY descritos são compostos de duas etapas: delipidação da gema, que consiste em separar as livetinas das demais lipoproteínas, e purificação do extrato aquoso para separação das IgY de outros componentes (BERNARDO, 2009).

A purificação do IgY do extrato aquoso é feita após a etapa de delipidação. Existem três métodos, amplamente descritos na literatura, que são realizados de forma isolada ou em associação, são eles: precipitação com sais, cromatografia de afinidade e ultrafiltração (MOREIRA, 2007).

Bernardo (2009) analisou os métodos de precipitação com PEG-6000 e sulfato de amônio 25% e constatou que o método de PEG-6000 foi mais eficiente que o de sulfato de amônio, pois foi capaz de extrair IgY da gema de ovos com alto grau de pureza, concordando com os dados encontrados neste trabalho.

Por outro lado, o resultado encontrado discorda de outros autores que afirmam que este seria o método mais eficiente de purificação com alta pureza (SVENDSEN et al, 1995; ARAÚJO, 2007).

Na análise das proteínas na eletroforese pelo perfil de peso molecular, nota-se que a banda de IgY encontra-se abaixo de 200 kDa, por volta de 169 kDa. Há divergência quanto ao PM da IgY, alguns autores afirmaram ter esta molécula 167,25 kDa (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004), enquanto Leslie e Clem (1969) relataram um peso molecular de até 206 kDa, Devi et al. (2002) estabeleceram seu peso em 190 kDa e outros autores relatam um peso molecular de 180 kDa (VASCONCELOS, 2010; TAN et al., 2012). No entanto foi estabelecido pela maioria dos autores em torno de 180kDa (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; AKITA; LI-CHAN; NAKAI, 1998; BIZANOV; JONAUSKIENÉ, 2003).

A resposta do IgY das galinhas aos antígenos inoculados foi obtida por meio de testes sorológicos.

No teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), nenhuma das galinhas do grupo controle (Grupo 1) reagiu ao teste. No grupo imunizado com a vacina B19 (Grupo 2), as duas galinhas começaram a reagir no teste a partir da 2ª coleta (uma semana após a primeira inoculação) e continuaram a ser reagentes até a 7ª coleta (13ª semana). No Grupo 3, imunizado com EPS, uma das galinhas começou a reagir na 2ª coleta e apresentou-se reagente até a 7ª coleta; a outra galinha reagiu a partir da 4ª coleta até a 7ª. As amostras testadas no AAT não foram encaminhadas para o teste confirmatório 2-mercaptoetanol (2-ME) por não possuírem quantidades suficientes para

realização do teste. No Quadro 1, podem-se observar os resultados do teste AAT para amostras de soro sanguíneo das galinhas de cada grupo.

Quadro 1 - Resultados do teste AAT realizado em amostras individuais de soro sanguíneo das galinhas do Grupo 1 (controle), Grupo 2 (vacina B19) e Grupo 3 (Extrato proteico solúvel –EPS).

IDENTIFICAÇÃO COLETA		RESULTADO AAT	
		IDENTIFICAÇÃO GALINHAS	
		3	4
GRUPO 1 (CONTROLE)	1ª (PRÉ-INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO
	2ª	NEGATIVO	NEGATIVO
	3ª	NEGATIVO	NEGATIVO
	4ª	NEGATIVO	NEGATIVO
	5ª	NEGATIVO	NEGATIVO
	6ª	NEGATIVO	NEGATIVO
	7ª	NEGATIVO	NEGATIVO
IDENTIFICAÇÃO COLETA		IDENTIFICAÇÃO GALINHAS	
		1	2
GRUPO 2 (VACINAB19)	1ª (PRÉ-INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO
	2ª	POSITIVO	POSITIVO
	3ª	POSITIVO	POSITIVO
	4ª	POSITIVO	POSITIVO
	5ª	POSITIVO	POSITIVO
	6ª	POSITIVO	POSITIVO
	7ª	POSITIVO	POSITIVO
IDENTIFICAÇÃO COLETA		IDENTIFICAÇÃO GALINHAS	
		12	14
GRUPO 3 (EPS)	1ª (PRÉ-INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO
	2ª	NEGATIVO	POSITIVO
	3ª	NEGATIVO	POSITIVO
	4ª	POSITIVO	POSITIVO
	5ª	POSITIVO	POSITIVO
	6ª	POSITIVO	POSITIVO
	7ª	POSITIVO	POSITIVO

As galinhas do Grupo 1 (controle) não reagiram ao teste, o que já era esperado, uma vez que não se utilizou nenhum antígeno na imunização dessas aves. No Grupo 2 (imunizado com a vacina B19), as galinhas começaram a reagir uma semana após a primeira imunização e mantiveram-se reagentes até a última coleta após a sexta inoculação. Tal fato está de acordo com o encontrado por Kumar et al. (1984), que observaram que oito galinhas inoculadas com suspensão de *Brucella abortus* foram reagentes ao teste AAT uma semana após a imunização. Seis das oito galinhas foram sacrificadas no 15º dia e as duas restantes foram analisadas quanto à resposta ao teste

AAT até o 43º dia. Estas mantiveram-se positivas até a última coleta, porém, diferentemente do experimento executado neste trabalho, elas receberam apenas uma inoculação do antígeno.

Schade et al. (2005) também observaram que as galinhas podem produzir anticorpos com alta avidéz logo após a primeira imunização. Esta produção depende de algumas variáveis, as quais incluem o tipo de antígeno (dose e peso molecular), o adjuvante, a via de administração, a genética do animal e o tipo de criação (SCHADE et al., 2005). Resultados obtidos no Grupo 2, imunizado com a vacina B19, demonstraram que as variáveis utilizadas neste grupo foram adequadas para a produção de anticorpos na semana após a primeira imunização.

No Grupo 2, a resposta das galinhas foi semelhante à encontrada em bovinos uma semana pós-vacinação. Nos bovinos infectados por *Brucella abortus* ou vacinados com amostra B19, a resposta imune caracteriza-se pela presença de quatro isotipos principais de imunoglobulinas. Na primeira semana pós-infecção ou vacina, são produzidos o isotipo IgM e, logo após, o IgG1, detectáveis no teste AAT (BRASIL, 2006).

O fato de as galinhas terem respondido logo na primeira semana após a inoculação coincidindo com mamíferos, pode ser explicado pela semelhança funcional existente entre IgY e IgG, tendo as aves uma resposta de anticorpos geralmente similar à observada em mamíferos (SCHADE et al., 1996; SCHADE et al., 2005). A IgM é formada predominantemente durante a resposta primária, sendo detectada 72 horas após a inoculação de um antígeno; entretanto, a resposta é curta. Após uma única inoculação de um antígeno proteico, ocorre um pico de IgM entre o 4º e o 8º dia, que declina rapidamente e é acompanhado pela produção de anticorpos IgY. Entretanto, a quantidade e a qualidade dessa resposta dependem de diversos fatores como: dose do imunógeno, tipo de adjuvante, via de aplicação, linhagem de galinha, idade e manejo (SCHADE et al., 2005).

Vale salientar que a reatividade das imunoglobulinas Y foi devido à elevada especificidade para a ligação e inativação de substâncias externas, tais como moléculas tóxicas ou antígenos, que são capazes de invadir o corpo (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

A *Brucella abortus* não é um agente patogênico significativo em espécies aviárias (DETILLEUX; CHEVILLE; DEYOE, 1988), por esse motivo, poucas

pesquisas são realizadas com *Brucella abortus* em aves e poucos trabalhos são encontrados para discutir a resposta observada.

O grupo 3 apresentou uma resposta variável, pois as duas galinhas do grupo responderam de forma diferente, sendo que a galinha nº 14 apresentou a mesma resposta do grupo 2, porém a de nº 12 reagiu positivamente ao teste AAT a partir da quarta coleta, após a terceira imunização com o EPS, até a última coleta. Acredita-se que tal resposta, se deve ao fato de a dose inicial não ter sido suficiente para induzir a produção de anticorpos nesta galinha. Com isso, talvez seja necessário aumentar a dose inicial para padronizar a resposta nos animais, já que as condições experimentais foram iguais para as duas galinhas.

O EPS é um antígeno novo que ainda vem sendo estudado por esse grupo de estudo, contudo não se sabe a resposta que ele pode desempenhar nos animais, as galinhas foram as primeiras a serem testadas para este antígeno, logo se faz necessário um estudo para padronização da resposta.

Tanto as galinhas imunizadas com a vacina B19 quanto as imunizadas com o EPS apresentaram-se reagentes ao teste, podendo ser considerados bons imunógenos por induzirem a produção de anticorpos, porém não se sabe em relação ao diagnóstico se este é um achado bom ou ruim, se pode ser considerado ou não uma interferência nos testes, assim como ocorre com a IgG bovina de fêmeas recém-vacinadas com vacina B19.

Na parede externa da *Brucella abortus* existe uma estrutura formada por moléculas de constituição lipopolissacarídica (LPS), composta de lipídios A, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacarídica mais exposta, denominada cadeia O. Esta cadeia é o componente antigênico mais importante da bactéria, responsável pela imunidade humoral às brucelas lisas, tendo um papel essencial no sorodiagnóstico (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Mesmo que no processo de extração do EPS tenham sido perdidas PMEs, que atuam como importantes imunógenos em bactérias Gram-negativas, o EPS ainda apresentou interferência no teste de AAT. Portanto, acredita-se que a cadeia O do LPS pode não ter sido perdida no processo de extração, reagindo ao teste.

Em virtude disso, as galinhas do Grupo 3 podem ter respondido a esta porção antigênica e, conseqüentemente, apresentado reação positiva ao teste de triagem AAT.

Para ser um bom teste diagnóstico, ele deve ter alta sensibilidade e especificidade, ou seja, capaz de detectar verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, segundo Thrusfield (2004).

O teste de triagem, que serve para detectar animais reagentes, precisa ter boa sensibilidade, ser barato e de fácil execução. Já o teste confirmatório deve ter boa sensibilidade e especificidade muito alta. A realização de testes em sequência, quando se faz o teste confirmatório em indivíduos reagentes ao teste de triagem, aumenta a especificidade do procedimento diagnóstico e diminui o número de falso-positivos. Com esse objetivo no controle da brucelose, utiliza-se o teste do Antígeno Acidificado Tamponado como teste de triagem, seguido de teste confirmatório (2-mercaptoetanol ou fixação de complemento) nos animais reagentes (BRASIL, 2006).

Devido à insuficiência da quantidade das amostras de soro sanguíneo das galinhas, não foi possível confirmar se as amostras consideradas reagentes no teste de triagem, AAT, foram também reagentes no teste 2-ME. No entanto, testaram-se amostras de *pool* semanal de IgY extraído da gema do ovo das galinhas dos três grupos.

Nos testes AAT e 2-ME realizados com amostras de *pool* semanal de IgY extraído da gema do ovo, os Grupos 1 (Controle) e 3 (EPS) não reagiram aos testes AAT e 2-ME, já o Grupo 2 (vacina B19) foi reagente ao teste AAT a partir da 5ª semana até a 13ª semana; e no teste 2-ME, este grupo foi reagente com título de 200:200 a partir da 8ª semana até a 13ª semana, da 5ª à 7ª semana, o grupo foi inconclusivo ao teste 2-ME. Os resultados podem ser visualizados no Quadro 2.

Quadro 2- Resultados dos testes AAT e 2-ME realizados no *pool* semanal de amostras de IgY extraído da gema do ovo de cada grupo.

IDENTIFICAÇÃO		AAT	RESULTADO TESTE SAL / 2-ME	TÍTULO SAL / 2-ME
CONTROLE	1ª SEMANA (PRÉ-INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	25:NR
	2ª SEMANA (1ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	3ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	4ª SEMANA (2ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	5ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	6ª SEMANA (3ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	7ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	8ª SEMANA (4ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	9ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	10ª SEMANA (5ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	11ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	12ª SEMANA (6ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	13ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
AgT B19	1ª SEMANA (PRÉ-INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	2ª SEMANA (1ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	3ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	4ª SEMANA (2ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	5ª SEMANA	POSITIVO	INCONCLUSIVO	200:NR
	6ª SEMANA (3ª INOCULAÇÃO)	POSITIVO	INCONCLUSIVO	200:NR
	7ª SEMANA	POSITIVO	INCONCLUSIVO	200:NR
	8ª SEMANA (4ª INOCULAÇÃO)	POSITIVO	POSITIVO	200:200
	9ª SEMANA	POSITIVO	POSITIVO	200:200
	10ª SEMANA (5ª INOCULAÇÃO)	POSITIVO	POSITIVO	200:200
	11ª SEMANA	POSITIVO	POSITIVO	200:200
	12ª SEMANA (6ª INOCULAÇÃO)	POSITIVO	POSITIVO	200:200
	13ª SEMANA	POSITIVO	POSITIVO	200:200
EPS	1ª SEMANA (PRÉ-INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	2ª SEMANA (1ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	3ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	4ª SEMANA (2ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	NR:NR
	5ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	25:NR
	6ª SEMANA (3ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	25:NR
	7ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	50:NR
	8ª SEMANA (4ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	50:NR
	9ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	50:NR
	10ª SEMANA (5ª INOCULAÇÃO)	NEGATIVO	NEGATIVO	50:NR
	11ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	50:NR
	12ª SEMANA (6ª INOCULAÇÃO)	NÃO HOUVE OVOS	NÃO HOUVE OVOS	-
	13ª SEMANA	NEGATIVO	NEGATIVO	50:NR

Ao analisar os resultados, observou-se que o Grupo 2 permaneceu reagente aos testes AAT e 2-ME com o IgY extraído da gema do ovo.

Em 1893, Klemperer demonstrou que a imunização de uma ave resultou na transferência de anticorpos específicos do soro para a gema do ovo. A passagem transovariana da IgY demora aproximadamente de 3 a 6 dias (PATTERSON et al., 1962; WOOLLEY et al., 1995; MOHAMMED et al., 1998). A quantidade de IgY transferida para a gema do ovo tem sido relatada como proporcional à concentração de IgY no soro sanguíneo da galinha (LOEKEN; ROTH, 1983; MORRISSON et al., 2002; AL-NATOUR et al., 2004; HAMAL et al., 2006).

No Grupo 2, para o teste AAT, nota-se que os dados obtidos neste trabalho não concordaram com os autores acima citados, uma vez que a resposta de anticorpos do *pool* de IgY extraído da gema do ovo deste grupo foi tardia em relação aos dados encontrados por Patterson et al. (1962), Woolley et al. (1995) e Mohammed et al. (1998), pois, pelo teste AAT, observa-se que o IgY extraído do ovo foi reagente 2 semanas após o IgY sérico apresentar reação no teste.

No teste 2-ME, observa-se que o Grupo 2 apresentou três reações inconclusivas nas quinta, sexta e sétima semanas, em um título de 200:NR, o que indica que as amostras poderiam estar com baixa concentração de IgY, não sendo detectado no teste de 2-ME, já que nas semanas posteriores até a 13^a semana as galinhas desse grupo apresentaram-se reagentes ao teste em um título de até 200:200.

No Grupo 3, pode ser que tenha ocorrido uma reação inespecífica no teste de AAT para o soro sanguíneo das galinhas, tendo em vista que o *pool* de IgY extraído do ovo não reagiu aos testes de AAT e 2-ME. Tal reação poderia ser denominada como efeito prozona, que resulta em resultados falso-negativos devido à alta concentração de anticorpos em relação a concentração do antígeno do teste.

Na padronização do teste de ELISA indireto do IgY proveniente do soro sanguíneo e da gema do ovo de galinhas verificou-se haver melhor resposta na sensibilização da placa com concentração de EPS igual a 10 µg/mL e com a diluição da vacina B19 igual a 1:100. A diluição de anticorpos primários e secundários que apresentaram melhor resposta para as placas sensibilizadas com diferentes antígenos foi de 1:100 e 1:5000, respectivamente.

Na validação com amostras de soro sanguíneo de galinhas, observou-se que a partir da 1^a semana pós-imunização no Grupo 2 houve aumento no título de anticorpos específicos anti-vacina B19. Já no Grupo 3, este aumento no título de anticorpos

específicos anti-EPS também ocorreu, porém foi bem discreto (Figura 9 e 10), embora esta resposta tenha sido baixa neste grupo. O resultado se assemelha aos encontrados por Guimarães; Correia; Gama Filho (2008), que constataram que após o primeiro inóculo as aves iniciam a produção de anticorpos e dentro de poucos dias os mesmos já podem ser encontrados na gema do ovo das galinhas.

Nas Figuras 11 e 12, o pico maior da atividade de anticorpos foi observado 1 semana após a 4ª imunização para o Grupo 2 (imunizado com vacina B19) e após a 6ª imunização para o Grupo 3 (imunizado com EPS).

A produção de anticorpos é ativada nos animais após a inoculação do antígeno. As substâncias com peso das moléculas menor que 1000 Da não possuem a capacidade de provocar a produção de anticorpos. Macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, são altamente imunogênicas, e estimulam fortemente a resposta imune. Outro fator indispensável para a produção de anticorpos é a capacidade do animal imunizado de reconhecer o antígeno e produzir proteínas com alta afinidade e especificidade ao antígeno (SOUSA, 2008).

Desta forma, nota-se que os antígenos utilizados para as imunizações nas galinhas foram capazes de desempenhar a atividade de anticorpos, conforme mostra a Figura 11. Uma vez que os antígenos B19 e EPS são proteínas com pesos moleculares maior que 1000 Da, ativando, desta forma, o sistema imune das galinhas, estimulando a produção de anticorpos.

A atividade dos anticorpos do grupo controle (Grupo 1), quando testado com os antígenos B19 e EPS no ELISA indireto, foi baixa e permaneceu inalterada durante o experimento, indicando uma atividade específica insignificante e, portanto, poderia ser empregada como um controle negativo em experiências subsequentes.

Figura 11: Curva de absorbância de IgY nas amostras de soro sanguíneo de galinhas dos grupos controle e B19 obtidas pelo teste ELISA indireto, utilizando como antígeno o B19, durante 13 semanas.

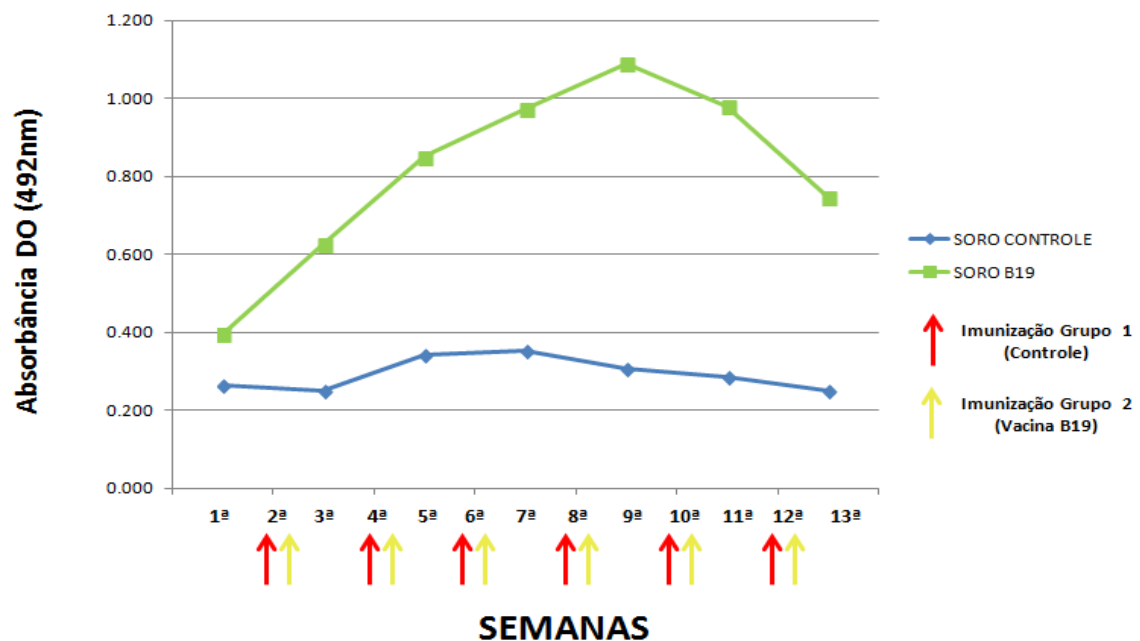
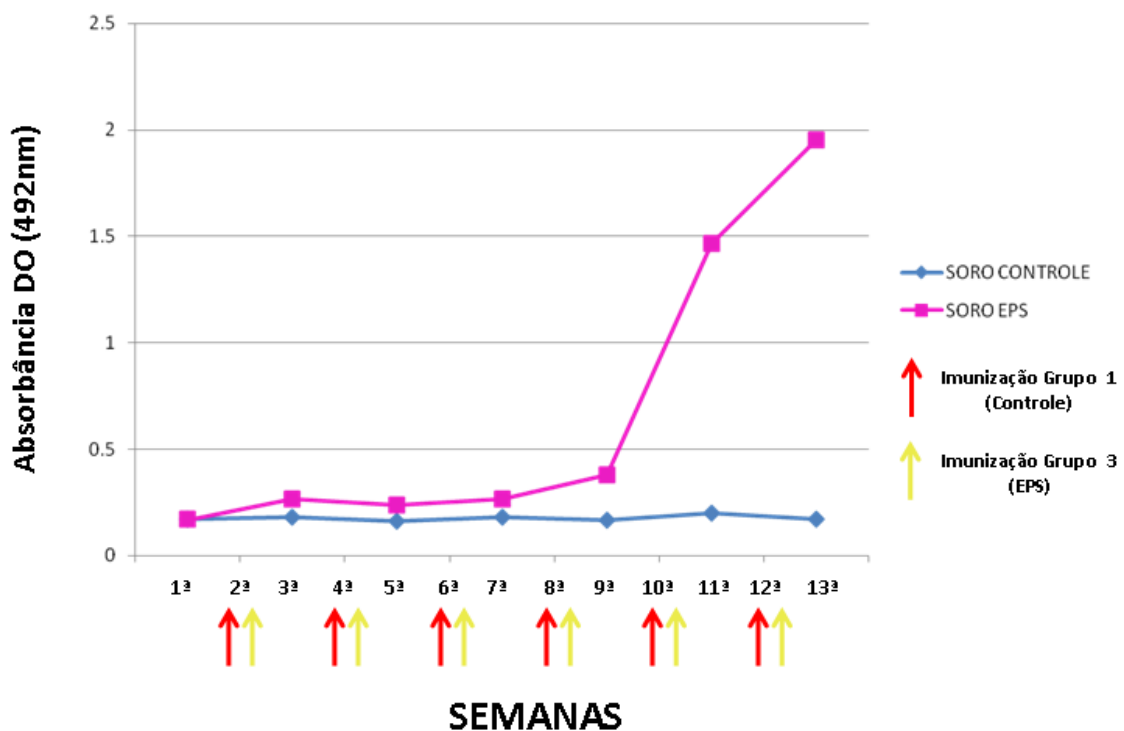


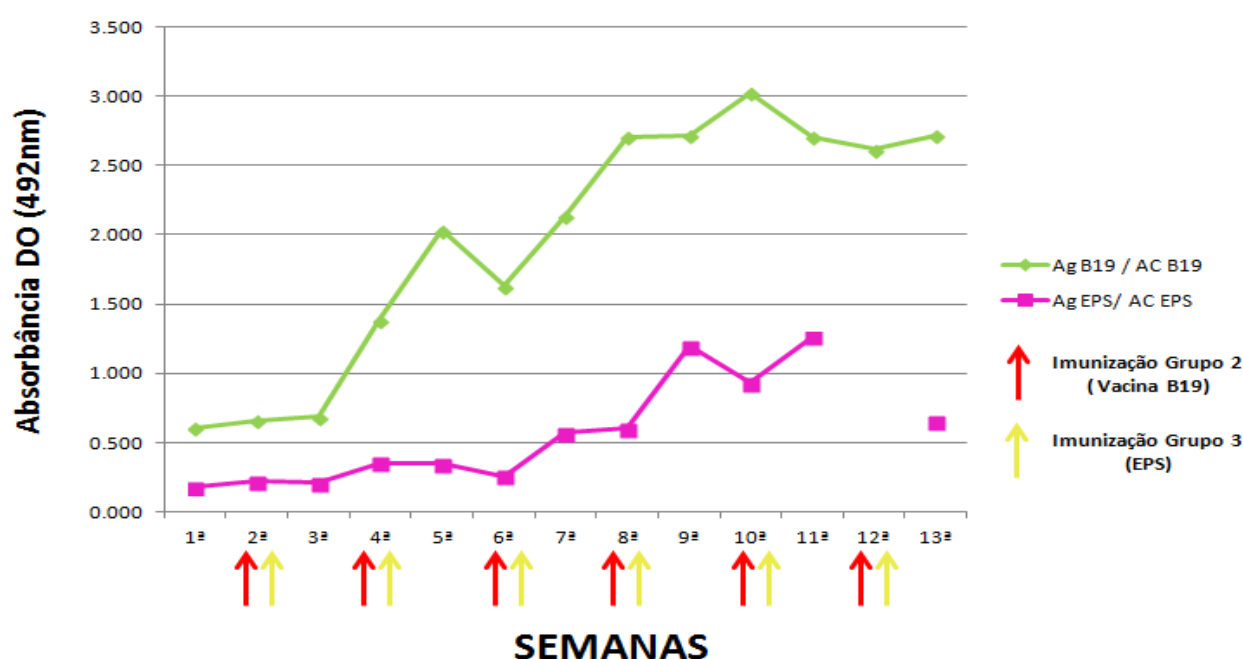
Figura 12: Curva de absorbância de IgY nas amostras de soros de galinhas dos grupos controle e EPS obtidas pelo teste ELISA indireto, utilizando como antígeno o EPS, durante 13 semanas.



O pico na produção de anticorpos ocorreu após a 4ª imunização, tanto para as galinhas imunizadas com a vacina B19 como para as imunizadas com EPS. No entanto, para o grupo das galinhas imunizadas com vacina B19, o pico ocorreu na primeira semana após a 4ª imunização (9ª semana); já no grupo das galinhas imunizadas com EPS, o pico ocorreu na semana da 7ª coleta (13ª semana), porém apresentou aumento de na concentração de anticorpos após a 4ª imunização.

Avaliou-se também a cinética de produção de IgY extraído da gema do ovo para os Grupos 2 e 3, conforme Figura 13.

Figura 13: Cinética de produção de IgY nas amostras de gema de ovo de galinhas imunizadas com os antígenos vacina B19 e EPS obtida pelo teste ELISA indireto durante 13 semanas.



O Grupo 2 apresentou maior resposta em níveis de anticorpos comparado ao Grupo 3.

Observa-se, na 4ª semana, um pequeno aumento na produção de anticorpos no Grupo 3, já no Grupo 2 a produção de anticorpos foi bastante visível, uma vez que apresentou um aumento considerável no valor da absorbância.

A IgY é exclusivamente transferida para a gema do ovo por um processo mediado por receptor (MOHAMMED et al., 1998; MORRISON et al., 2002). A

quantidade de IgY transferida é dependente da concentração sérica, e parece que toda a população de IgY é transferida (MORRISON et al., 2002). A passagem transovariana da IgY leva aproximadamente 5 dias (MOHAMMED et al., 1998).

Tal aumento, observado no Grupo 2, coincide com a resposta observada no teste AAT para o *pool* de IgY extraído da gema do ovo, mostrando mais uma vez que a transferência de anticorpos séricos para o ovo foi tardia em relação ao observado por Patterson et al. (1962), Woolley et al. (1995) e Mohammed et al. (1998), obtendo-se um período de 15 dias para esta transferência.

No grupo 2, a produção de anticorpos é bem maior em relação ao grupo 3. Esta diferença, provavelmente, pode estar relacionada com a diferença de imunogenicidade entre os antígenos (BIZHANOV; VYSHNIAUSKIS, 2000).

No grupo 3, pode-se observar uma queda na produção de anticorpos após a 9^a semana, na 13^a semana também houve uma queda, porém não se pode observar se foi após a 11^a ou 12^a semana, uma vez que as galinhas desse grupo não botaram na 12^a semana. No grupo 2 também houve uma queda na produção de anticorpos após a 10^a semana.

Segundo Chen et al. (2002) e Pauly et al. (2009), a queda na concentração de anticorpos não é um fenômeno desejado, e sua ocorrência pode ser revertida por meio de reaplicação do antígeno.

Quando se compara a resposta sérica e a resposta na gema, observa-se que a detecção de anticorpos na gema ocorre com um atraso de aproximadamente quinze dias, depois da detecção sérica, fato que pode ser explicado pelo tempo requerido para desenvolvimento do folículo ovariano e ovopostura (PEI; COLLISSON, 2005; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008).

As aves, neste estudo, representaram uma boa opção para produção de anticorpos IgY anti-antígeno utilizado na imunização, uma vez que os resultados foram bastante satisfatórios em relação à interação dos anticorpos produzidos com os antígenos utilizados na imunização.

Diante dos resultados obtidos, acredita-se que os anticorpos IgY produzidos pelo estímulo dos antígenos vacina B19 e EPS podem ser considerados importantes ferramentas para serem utilizadas em testes diagnósticos, por apresentarem uma boa resposta aos testes avaliados neste estudo. Além disso, o EPS revelou-se um potencial imunógeno vacinal, por desencadear resposta imune humoral nas galinhas, porém são

necessários mais estudos com este antígeno para padronização de seu uso como imunógeno ou como antígeno para diagnósticos sorológicos.

2.4 CONCLUSÃO

Galinhas imunizadas com a vacina B19 e com EPS de *Brucella abortus* produziram anticorpos IgY reativos a cada um desses antígenos detectáveis por teste ELISA indireto. Além disso, o EPS mostrou ser um potencial antígeno para ser utilizado em testes diagnósticos.

REFERÊNCIAS

- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.2, n.160, p.207-214, 1993.
- AKITA, E. M.; LI-CHAN, E. C.; NAKAI, S. Neutralization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, v.10, n.2, p.161–172, 1998.
- AL DAHOUK, S.; et al. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. **Journal of Immunological Methods**, Munich, v. 309, n. 1-2, p. 34-47, Fev. 2006.
- AL-NATOUR, M. Q.; et al. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious brucella disease virus. **Avian Diseases**, Irbid, v. 48, n. 1, p. 177-182, 2004.
- ARAGON, V.; et al. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. **Journal of Bacteriology**, Pamplona, v. 178, n. 4, p. 1070–1079, Fev. 1996.
- ARAÚJO, A. S. **Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- ARAÚJO, A. S.; et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon**, Belo Horizonte, v. 55, n. 4, p. 739–744, Abril 2010.
- BARBAS III, C. F.; et al. **Phage Display: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- BERNARDO, A. R.. **Tecnologia IgY: produção de anticorpos aviários para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o uso ético dos animais de experimentação**. 2009. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

BIZHANOV, G.; VYSHNIAUSKIS, G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.24, n.2, p.103–113, 2000.

BIZANOV, G.; JONAUSKIENÉ, I. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Vilnius, v.47, n. 2, p.403-410, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.72, p.248-254, Mai., 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose** – PNCEBT: legislação. Brasília, DF:188p., 2006.

CARLANDER, D.; et al. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies. **Egg Nutrition and Biotechnology (Ed JS Sim)**, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, Book, p.371-374, 1999.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody: *in vitro* and *in vivo***. 2002. 53f. Tese (Doutorado em Química Clínica) – Faculdade de Medicina, Uppsala University, Suécia, 2002.

CHACANA, P.A.; et al. Tecnologia IgY o aplicaciones de lós anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v.85, n.5, p.179-189, 2004.

CHAUDHURI, P.; et al. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. **Molecular and Cellular Probes**, Izatnagar, v. 24, n. 3, p. 142-145, Jun. 2010.

CHEN, C. C.; et al. Isolation and characterization of immunoglobulin in yolk (IgY) specific against hen egg white lysozyme by immunoaffinity chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.19, p. 5424-5428, 2002.

CLOECKAERT, A.; et al. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. **Infection and Immunity**, Brussels, v. 58, n. 12, 3980-3987, 1990.

CLOECKAERT, A.; ZYGMUT, M. S.; GUILLOTEAU, L. A.. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low level of M- like O-antigen. **Vaccine**, Nouzilly, v. 20, n. 13-14, p. 1820-1822, Março 2002.

CORBEL, M. J.; STUART, F. A.; BREWER, R. A.. Observations on serological cross-reaction between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. **Developments in Biological Standardization**, v. 56, p. 341-348, 1984.

DAVISON, F.; MARGOR, K. E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**, San Diego: Elsevier, 2008, 481 p.

DEBBARH, H. S.; et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Partially Purified Cytosoluble 28-Kilodalton Protein for serological differentiation between *Brucella melitensis*-Infected and *B. melitensis* Rev.1-Vaccinated Sheep. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Nouzilly, v. 3, n. 3, p. 305-308, May 1996.

DETILLEUX, P. G.; CHEVILLE, N. F.; DEYOE, B. L. Pathogenesis of *Brucella abortus* in Chicken Embryos. **Veterinary Pathology on line**, Ames, v. 25, n. 2, p. 138-146, Março 1988.

DEVI, C. M; et al. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v.51, n.1, p.129-138, 2002.

DOUGLAS, J. T.; et al. Porins of *Brucella* species. **Infection and Immunity**, Honolulu, v. 44, n. 1, p.16-21, Abr. 1984.

DUBRAY, G.; PLOMMET, M.. Structure et constituants des *Brucella*. Caracterisation des fractions et proprietes biologiques. **Developments Biological Standardization**, Nouzilly, v. 31, p.68-91, 1976.

DUBRAY, G.; BEZARD, G.. Isolation of three protective cell-wall antigens of *Brucella abortus* in experimental brucellosis in mice. **Annals of Veterinary Research**, Nouzilly, v. 11, n. 4, p. 367-373, 1980.

DUBRAY, G.; CHARRIAULT, C.. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. **Annals of Veterinary Research**, Nouzilly, v. 14, n. 3, p. 311-318, 1983.

GODFROID, J.; et al. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when a specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Veterinary Microbiology**, Brussels, v. 90, n. 1-4, p. 461-477, 2002.

GOLDBAUM, F. A.; et al. Characterization of an 18-Kilodalton *Brucella* Cytoplasmic Protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**. Buenos Aires, v. 31, n. 8, p. 2141-2145, Aug. 1993.

GOMEZ-MIGUEL, M. J.; MORIYON, I.. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. **Infection and Immunity**, Pamplona, v.53, n. 3, p. 678-684, Set., 1986.

GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Zürich, v. 71, n. 2, p. 273-278, 1985.

GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G., GAMA FILHO, R. V.. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas on line**, Espírito Santo, v. 2, n. 7, 2008.

HAMAL, K. R.; et al. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poultry science**, Fayetteville, v. 85, n. 8, p. 1364-1372, 2006.

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

KLEMPERER, F.. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1893; 31, 356-382 apud NARAT, M.. Production of antibodies in chickens. **Food Technology and Biotechnology**; Domzale, v. 41, n. 3, p. 259-267, 2003.

KITTELBERGER, R. et al. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. **Veterinary Microbiology**, New Zealand, v. 60, n.1, p.45–57, 1998.

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

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v.1130, n.6, p. 1337-1352, 1969.

LIN, M.; NIELSEN, K.. Binding of the *Brucella abortus* Lipopolysaccharide O-chain Fragment to a Monoclonal Antibody. **The journal of biological chemistry**, Ontario, v. 272, n. 5, p. 2821–2827, Jan. 1997.

LOEKEN, M. R.; ROTH, T. F.; Analysis of maternal IgG subpopulations are transported into the chicken oocyte. **Immunology**, Boston, v.49, n. 1, p. 21-28, 1983.

KUMAR, S.; et al. Brucellosis in poultry – Na experimental study. **Internacional Journal of Zoonoses**, Hissar, v. 11, p. 133-138, 1984.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; PARKER, J.; **Microbiologia de Brock**. Pearson: Pretince Hall, 531 p., 2004.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C.O.. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Editora Embrapa Gado de Corte, 360p., 2001.

MEGID, J.; et al. **Avaliação das Provas de Soroaglutinação Rápida, Soroaglutinação Lenta, Antígeno Acidificado e 2-mercaptoetanol no Diagnóstico da brucelose Bovina**. Brazilian Journal of Veterinary Reserch and Animal Science. São Paulo, v.37, n.5, p. 395-399, 2000.

MOHAMMED, M. S.; et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, Ontario, v. 4, n. 2, p. 115-125, Out., 1998.

MOLNAR, L.; et al. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p.157-162, 1997.

MOREIRA, A. S. A. S. **Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MORRISON, S. L.; et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, Los Angeles, v. 38, n. 8, p. 619-625, Jan., 2002.

MORIYON, I.; BERMAN, D. T.. Isolation, purification, and partial characterization of *Brucella abortus* matrix protein. **Infection and Immunity**, Wisconsin, v. 39, n. 1, p.394-402, Jan., 1983.

NAVES, J. H. F. F.; et al. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Uberlândia, v. 24, n. 2, p. 283-287, 2012.

NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technology and Biotechnology**, Domzale, v.41, n.3, p.259–267, 2003.

NIELSEN, K.; et al. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Ontario, v. 100, n. 1-2, p. 25–30, 2004.

NIELSEN, K.; et al. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella sp.* and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Ontario, v. 109, n. 1-2, p. 69–78, 2006.

OMS – ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, **Comité Mixto FAO/OMS de Expertos em Brucelosis**. Genebra, 1986, 146 p.

PATTERSON, R.; et al. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. **Journal of Immunology**, Pennsylvania, v. 89, n. 2, p. 272-278, 1962.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: Situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154p.

PAULY, D.; et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, Champaign, v.88, n.2, p.281-290, 2009.

PEI, J.; COLLISSON, E. W. Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus. **Developmental and Comparative Immunology**, Texas, v. 29, n. 2, p. 153-160, 2005.

POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; VAN REGENMORTEL, M. H.. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communicatios**, United States, v. 9, n. 5, p. 475-493, 1980.

REZANIA, S.; AMIRMOZAFFARI, N.; TABARRAEI, B.; JEDDI-TEHRANI, M.; ZAREI, O.; ALIZADEH, R.; MASJEDIAN, F.; ZARNANI, A. H. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, Tehran, v. 3, n. 1, Jan.-Mar. 2011.

SANTOS, J. M.; et al. Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. **Infection and Immunity**, New York, v. 46, n. 1, p. 188-194, Out., 1984.

SVENDSEN, L.; et al. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v.45, n.1, p.89-93, 1995.

SCHADE, R.; et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY - The report and recommendations of ECVAM workshop 21. **Alternative to Laboratory Animal: ATLA**, Nottingham, v.24, p.925-934, 1996.

SCHADE, R.; et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative to Laboratory Animals: ATLA**, Berlin, v. 2, n. 33, p. 129-154, 2005.

SOUSA, C. M.. **Produção de Anticorpos IgY de galinhas e IgG de coelhos para análise de auxina e citocininas**. 2008. 61 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

TAN, S. H; et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**. Australia, v. 380, n. 1-2, p.73-76, 2012.

TINI, M.; et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.131, n.3., p.569-574, 2002.

TIBOR, A.; DECELLE, B.; LETESSON, J.J.. Outer membrane proteins OMP 10, OMP 16 and OMP 19 of *Brucella spp* are lipoproteins. **Infection and Immunity**, Belgium, v. 67, n. 9, p. 4960-4962, 1999.

THRUSFIELD, M.. **Testes de diagnósticos:** em epidemiologia veterinária. 2.ed. São Paulo: Editora Roca, São Paulo, p. 323-346, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC): 2007. Laboratório de Protozoologia. **Extração de Proteínas**. Disponível em: http://www.proto.ufsc.br/downloads/protocolos/Extracao_proteinas.pdf. Acesso em: 21 de abril de 2011.

VASCONCELOS, G. A. L. B. M.. Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite **A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado**. 2012. 121f. Dissertação (Pós-graduação em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2010.

VERSTRAETE, D. R.; et al. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. **Infection and Immunity**, New York, v. 35, n. 3, p. 979-989, Mar., 1982.

VERSTRAETE, D. R.; WINTER, A. J.. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. **Infection and Immunity**, New York, v. 46, n. 1, p. 182-187, Out., 1984.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v.8, n.8, p.364-371, 2003.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, Charleston, v.16, n.8, p.392-398. 1995.

WEYNANTS, V.; et al. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9, a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. **Veterinary Microbiology**, Belgium, v. 48, n. 1-2, p. 101-112, 1996.

WRIGHT, P. F.; NIELSEN, K. H. Current and future serological methods, p. 305-320.
In: ADAMS, L. G.. **Advances in brucellosis research**. Texas A&M University Press,
College Station, 1990.

WRIGHT, P. F.; et al. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent
of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue scientifique et technique de l'office
international des epizooties**. Vienna, Austria , v.12, n. 2, p. 435-450, 1993.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE IMUNOGLOBULINAS Y DE GALINHAS IMUNIZADAS COM VACINA B19 E EPS

RESUMO - Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta da IgY extraída da gema do ovo das galinhas imunizadas com vacina B19 (IgY anti-B19) frente ao Extrato Proteico Solúvel (EPS) extraído da vacina B19, bem como a resposta do IgY extraído da gema de ovo de galinhas imunizadas com o EPS (IgY anti-EPS), frente à vacina B19 em teste de ELISA indireto. Foram sensibilizadas duas placas de imunoadsorção, uma com vacina B19 e outra com EPS. Em cada placa foram colocados como anticorpos primários imunoglobulinas IgY extraídas da gema do ovo, referente a cada grupo de galinhas imunizado, sendo um controle, um com vacina B19 e um com EPS. A IgY anti-B19 e o IgY anti-EPS foram reagentes aos antígenos testados. Os índices ELISA para o IgY anti-B19 foram superiores aos índices do IgY-EPS, indicando uma maior produção de anticorpos anti-B19. Acredita-se que esses anticorpos possam servir como ferramenta na identificação de antígenos em testes diagnósticos, e que os anticorpos IgY anti-B19 podem apresentar melhor resposta na identificação do antígeno em relação aos anticorpos IgY anti-EPS.

Palavras-chave: Vacina B19. Extrato proteico solúvel. Ensaio Imunoenzimático.

CHAPTER 3 - EVALUATION OF Y IMMUNOGLOBULIN REACTIVITY OF CHICKENS IMMUNIZED WITH B19 AND EPS

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the response of IgY extracted from egg yolk of immunized chickens with B19 vaccine (IgY Anti-B19) against the Soluble Protein Extract (EPS) extracted from B19 vaccine, as well as the response of the IgY extracted from egg yolk of chickens immunized with EPS (IgY Anti-EPS) against B19 vaccine in indirect ELISA. Two immunoabsorption plates were sensitized, one with B19 vaccine and another with EPS. Were placed on each plate as primary antibodies IgY immunoglobulins extracted from the egg yolk, for each group of immunized chickens, being a control, one with B19 vaccine and one with EPS. The IgY Anti-B19 and IgY Anti-EPS were reactive to the antigens tested. The ELISA indexes for IgY Anti- B19 were higher than those of IgY Anti-EPS, indicating a higher antibody IgY Anti-B19 production. It is believed that these antibodies may serve as a tool in identifying antigens in diagnostic tests, and the IgY Anti-B19 antibody may show a better response in the identification of antigen compared to the antibodies IgY Anti-EPS.

Keywords: Vaccine B19. Soluble protein extract. Immunoenzymatic assay.

3.1 INTRODUÇÃO

A produção de anticorpos policlonais em galinhas vem sendo estudada desde 1893, e a partir de 1980, a IgY extraída de ovos passou a ser disponibilizada comercialmente, conjugada a fluoresceína, fosfatase alcalina ou peroxidase (SCHIMIDT et al., 1989).

O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados pela imunização de aves poederias com o antígeno-alvo. O antígeno pode ser apresentado ao sistema imune como estruturas complexas (bactérias, vírus e parasitas) ou simples (proteínas, polissacarídeos e toxinas) (SCHADE et al., 2005).

A imunização de galinhas representa uma excelente alternativa na geração de anticorpos policlonais, pois a manutenção das aves é barata, a coleta dos ovos não gera estresse aos animais, o isolamento e a purificação de imunoglobulinas Y de alta afinidade é rápida e simples e a aplicabilidade da IgY é extensa (TINI et al., 2002).

Este método oferece vários benefícios quando comparado à produção em coelhos, pois evita-se a sangria dos animais para coleta de imunoglobulinas, já que somente ovos são coletados. Poucas imunizações são necessárias para obter longo período de títulos de imunoglobulina na gema de ovos, e a produção de ovos é intermitente e com média de duração de 18 meses, contribuindo para uma grande produção de IgY por longo período. Além disso, as imunoglobulinas conjugadas apresentam, em geral, baixa inespecificidade nos testes em que são utilizadas (SOUSA, 2008).

No futuro, devido a todas as vantagens da tecnologia IgY (baixo custo de produção; elevado título de anticorpos; estabilidade térmica; elevada especificidade; possibilidade de conjugação a enzimas, corantes fluorescentes ou outros sistemas de revelação; uso em kits para pesquisa de antígenos, determinantes celulares ou imunoglobulinas espécie-específicas; e emprego em sistemas de imunodiagnósticos automatizados), os anticorpos aviários serão amplamente utilizados pela ciência, incluindo a medicina veterinária e a humana (BERNARDO, 2009).

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas para detecção de anticorpos e/ou antígenos. A maioria das provas sorológicas baseia-se nas interações antígeno-anticorpo, e estas podem ser classificadas de acordo com a quantidade de moléculas que se interagem e a forma com que se observa tal interação. Quando essas moléculas se interagem em baixas concentrações e a resolução desse complexo só é evidenciada com

o auxílio de métodos colorimétricos ou fluorescentes (microtécnicas), as técnicas mais utilizadas são a imunofluorescência (IF), o radioimunoensaio (RIA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que detectam pequenas quantidades dessas interações (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Sabendo-se que houve uma boa reposta do IgY extraído da gema do ovo aos seus respectivos antígenos utilizados nas imunizações, conforme resultados obtidos no capítulo 2, objetivou-se neste estudo verificar a resposta do IgY extraído da gema do ovo de galinhas imunizadas com vacina B19 (IgY anti-B19) frente ao antígeno EPS e a resposta de IgY extraído da gema do ovo de galinhas imunizadas com EPS (IgY anti-EPS) frente ao antígeno B19, utilizando ELISA indireto, a fim de verificar possíveis interações antígeno-anticorpo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o número de registro CEUA/UFU 071/12.

3.2.1 Amostras utilizadas

Foram utilizadas amostras de IgY extraído da gema do ovos referente a 13 semanas de aves imunizadas com vacina B19 de *Brucella abortus* (IgY anti-B19), Extrato Proteico solúvel (EPS) extraído da vacina B19 (IgY anti-EPS), e com PBS adicionado de Adjuvante de Freund (Grupo Controle / IgY Controle), como mostra o item 2.2.3 do capítulo 2.

3.2.2 Antígenos utilizados

Para sensibilização da placa para o teste de ELISA indireto foram utilizados os antígenos vacina B19 e Extrato proteico solúvel (EPS) extraído da vacina B19, conforme protocolo de extração descrito no capítulo 2.

3.2.3 ELISA indireto para avaliar a resposta de aves a antígenos diferentes dos utilizados nas imunizações

Foi realizada a padronização e validação do ELISA indireto para estes antígenos.

3.2.3.1 Padronização do ELISA indireto dos anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas frente a diferentes antígenos utilizados na imunização

Foram utilizadas duas placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc), uma delas foi sensibilizada com três concentrações diferentes de EPS, sendo 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL, e a outra foi sensibilizada com três diluições diferentes da vacina B19, sendo 1:100, 1:500 e 1:1000. Os dois antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, pH8,6), colocados nas placas utilizando-se por poço um volume de 50 µL de acordo com as concentrações ou diluições mapeadas, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 µL/poço de Tampão fosfato de sódio (PBS 0.01M pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C. Após bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS e adicionaram-se 50µL do IgY previamente diluído em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e leite desnatado a 5% (PBSTM), e depois as placas foram levadas à estufa a 37°C por uma hora. Na placa sensibilizada com a vacina B19 utilizou-se um *pool* de IgY EPS (10 µL de cada semana) e um *pool* de IgY controle (10 µL de cada semana) em quatro diluições diferentes, sendo 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, todas adicionadas em duplicata. Na placa sensibilizada com o EPS utilizou-se um *pool* de IgY B19 (10 µL de cada semana das 13 semanas) e um *pool* de IgY controle (10 µL de cada semana das 13 semanas) em quatro diluições diferentes, sendo 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, todas adicionadas em duplicata.

Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 µL/poço do conjugado com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com

peroxidase (Sigma) nas diluições de 1:5000 e 1:10000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15 mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio. Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa, que foi mantida sem a exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

O teste de ELISA indireto foi padronizado de acordo com Wright et al. (1993) e Madruga; Araújo e Soares (2001).

As concentrações e diluições ideais foram as que apresentaram a maior diferença em densidade óptica (DO) entre amostras positivas (IgY anti-B19 e IgY anti-EPS) e negativas.

3.2.3.2 Validação do ELISA indireto dos anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas frente a diferentes antígenos utilizados na imunização

Duas placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço, sendo uma sensibilizada com EPS na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO₃ 0,1M, pH8,6) e a outra com vacina B19 na diluição de 1:100, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas. No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 µL/poço de Tampão fosfato de sódio (PBS 0.01M pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C. Após incubação foi realizado um ciclo de três lavagens com tampão PBS.

Após incubação com bloqueio e lavagens, foram adicionados às placas 50 µL/poço de anticorpos primários na diluição de 1:100, previamente diluídos em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e leite desnatado a 5% (PBSTM) e as mesmas foram levadas à estufa a 37°C por uma hora. Tanto na placa sensibilizada com EPS como na sensibilizada com vacina B19, os anticorpos primários utilizados foram um *pool*/semana (13 semanas) de IgY proveniente da gema do ovo de galinhas imunizadas com EPS, *pool*/semana (13 semanas) de IgY proveniente da gema do ovo de galinhas

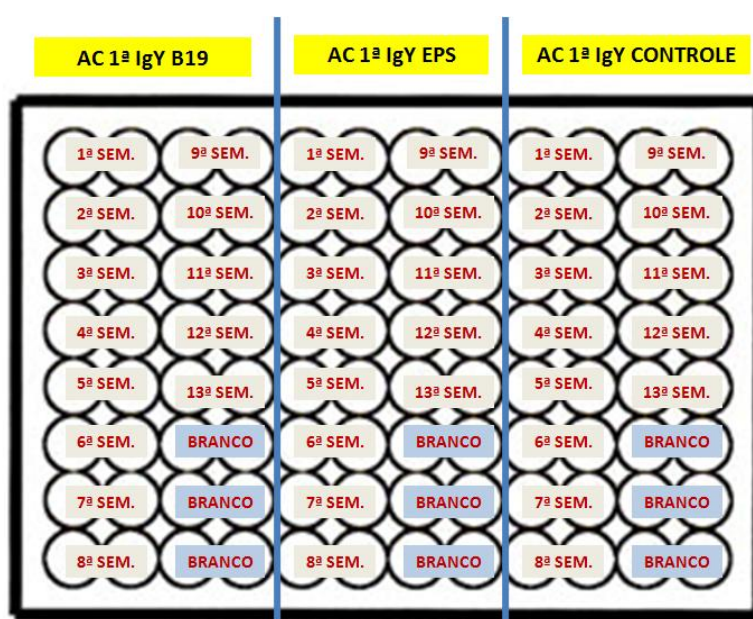
imunizadas com vacina B19 e *pool*/semana (13 semanas) de IgY proveniente da gema do ovo de galinhas do grupo controle, conforme mostra esquema da Figura 1.

Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão fostato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 µL/poço do conjugado com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com peroxidase (Sigma) nas diluições de 1:5000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio. Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa que foi mantida sem a exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

O ponto de corte (*cut-off*) foi calculado pela média da densidade óptica dos controles negativos previamente testados em duplicata somados a três vezes o desvio padrão desses valores (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), calculado como: $IE = DO_{amostra} / DO_{cut\ off}$, onde as amostras que apresentaram valores de $IE > 1,2$ foram consideradas positivas.

Figura 1: Esquema do protocolo utilizado na validação do teste ELISA indireto para as placas sensibilizadas com vacina B19 e EPS.



3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na padronização do teste de ELISA indireto do IgY proveniente do ovo de galinhas imunizadas frente a antígenos diferentes dos utilizados nas imunizações, verificou-se haver uma melhor resposta na sensibilização da placa com concentração de EPS igual a 10 µg/mL e com a diluição da vacina B19 igual a 1:100. A diluição de anticorpos primários e secundários que apresentaram melhor resposta para as placas sensibilizadas com diferentes antígenos foi de 1:100 e 1:5000, respectivamente.

Na validação, o *cut off* obtido para a placa sensibilizada com EPS foi de 0,396, já o obtido para a placa sensibilizada com B19 foi de 1,131, apresentando um valor maior em relação à placa com EPS. As amostras consideradas positivas foram as que obtiveram índice ELISA (IE) >1,2.

Na placa sensibilizada com EPS, conforme mostra a Figura 2, pode-se observar que o IgY anti-B19, apresentou-se reagente ao antígeno EPS a partir da 5ª semana até a 13ª semana, enquanto o IgY anti-EPS apresentou-se reagente a partir da 7ª semana até a 13ª semana, sem a avaliação da 12ª semana, pois não houve postura nesse período.

Na Figura 3, que representa resultados da placa sensibilizada com a vacina B19, pode-se observar que o antígeno B19 reagiu com o IgY anti-EPS a partir 7ª semana até a 13ª semana, sem avaliar a 12ª semana, na qual não houve postura. Este resultado apresentou semelhança ao encontrado na placa sensibilizada com EPS, mostrando que o IgY anti-EPS reconhece bem tanto o antígeno EPS utilizado na imunização das galinhas quanto o antígeno vacina B19.

Quando foi avaliado o IgY anti-B19 para esta placa observou-se que houve reação a partir da 4ª semana até a 13ª semana, mostrando que houve diferença na semana em que o IgY anti-B19 começou a reagir em relação à resposta observada destes anticorpos ao antígeno EPS. Tal fato pode ser explicado pelo antígeno usado na sensibilização da placa, que foi o mesmo utilizado na imunização das galinhas para obtenção do anticorpo IgY anti-B19, apresentando desta forma uma resposta mais específica ao antígeno vacina B19 em relação ao antígeno EPS.

Pôde-se observar também que, nas Figuras 2 e 3, os índices ELISA para o IgY anti-B19 foram superiores aos índices do IgY-EPS, nas duas placas. Tal fato indica que houve uma produção maior de anticorpo IgY anti-B19 que foi detectada pelos dois antígenos, uma vez que o EPS foi extraído a partir do antígeno vacina B19 e certamente

pode reconhecer bem este antígeno por ainda apresentar moléculas proteicas semelhantes à vacina B19.

Figura 2: Cinética do reconhecimento de antígenos através de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas com B19, EPS e controle, frente ao antígeno EPS.

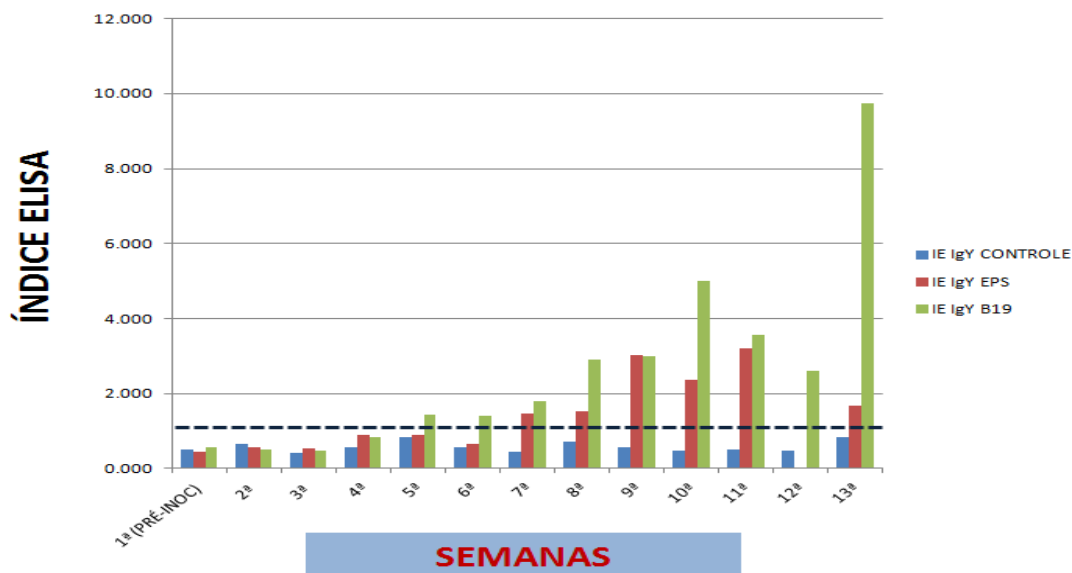
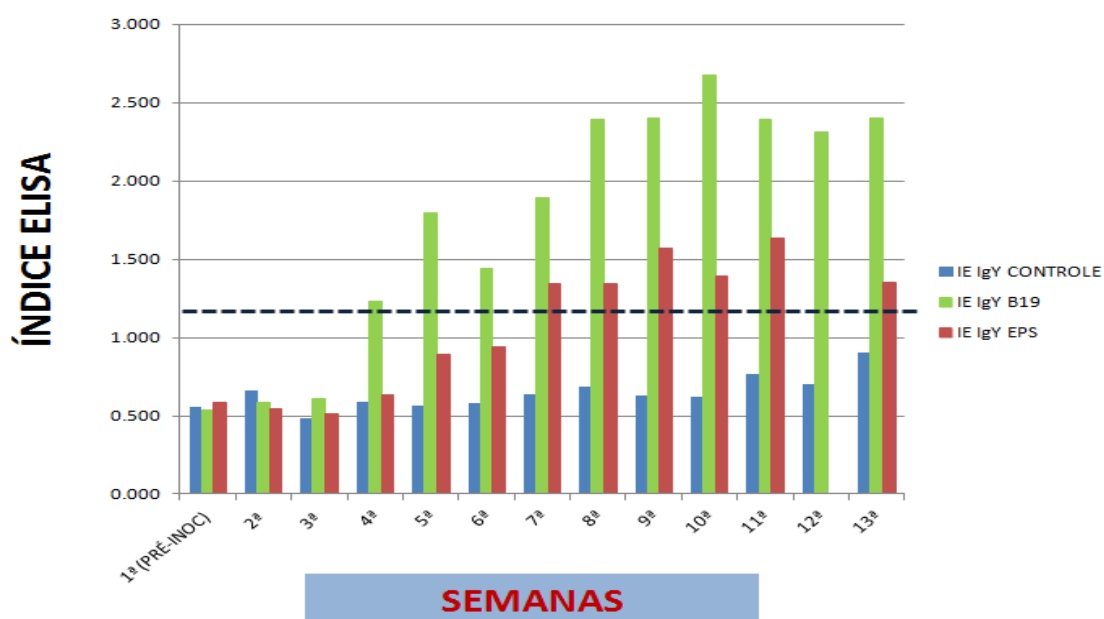


Figura 3: Cinética do reconhecimento de antígenos através de anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas imunizadas com B19, EPS e controle, frente ao antígeno B19.



Com os resultados obtidos, acredita-se que tanto o IgY anti-EPS quanto o IgY anti-B19 podem reconhecer porções de outras cepas de *Brucella abortus*.

As imunoglobulinas Y não se ligam a fatores reumatoides e a receptores Fc de bactérias e mamíferos, reduzindo então as ligações não específicas e minimizando a interferência em ensaios imunológicos envolvendo soro de mamíferos (LARSSON; SJÖQUIST, 1988; LARSSON; SJÖQUIST, 1990), desta forma, os anticorpos IgY apresentam vantagens em relação aos de mamíferos, que são geralmente usados para imunodiagnóstico, diminuindo assim a ocorrência de resultados falso-positivos (LARSSON et al., 1992).

Portanto, estes anticorpos (IgY anti-B19 e IgY anti-EPS) representam uma boa ferramenta para testes que visam a identificação de antígenos, devido a sua maior especificidade em relação ao IgG de mamífero, como relatado anteriormente por Larsson e Sjöquist (1988), Larsson e Sjöquist (1990) e Larsson et al. (1992).

Em relação à especificidade dos anticorpos, quando se deseja obter anticorpos de melhor qualidade é conveniente imunizar animais mais distantes filogeneticamente em relação à fonte do antígeno (TAN et al., 2012). Essa estratégia geralmente apresenta resultados satisfatórios. Como exemplo, para produzir anticorpos contra uma proteína humana é mais indicado usar coelho, cabra, camundongos do que macaco. No entanto, geralmente, as aves são mais eficientes para produzir anticorpos contra moléculas que apresentam baixa capacidade de provocar a produção de anticorpos em mamíferos (SOUSA, 2008).

Assim, quando galinhas e coelhos são imunizados com o mesmo antígeno mamífero, frequentemente a galinha responde com produção de anticorpos específicos que são raramente vistos nos coelhos (HUOPALAHTI et al., 2007).

Várias publicações têm descrito o sucesso na utilização de IgY em inúmeras pesquisas (GASSMANN et al., 1990; SCHADE et al., 2001; CARLANDER, 2002; DAVIS; REEVES, 2002; HUOPALAHTI et al., 2007). Ensaio imunoenzimático utilizando IgY são usados para dosagem de proteínas e peptídeos através de ELISA e fluorescência, dentre outros, utilizados em pesquisas básicas. A IgY é utilizada com sucesso na detecção de antígenos de origem viral, bacteriana, vegetal e animal para avaliar a incidência de parasitas intestinais em animais domésticos (SCHNIERING; SCHADE; HIEPE, 1996; HUOPALAHTI et al., 2007) e a contaminação de alimentos com toxinas e drogas (PICHLER et al., 1998).

A tecnologia IgY, por suas inúmeras vantagens, destacando-se como principais, a alta especificidade do IgY, a produção de anticorpos em maior quantidade do que em mamíferos e a obtenção de anticorpos sem sangria do animal, tem substituído anticorpos de mamíferos por anticorpos IgY, que atualmente estão ganhando muito espaço no mercado biotecnológico.

Por demonstrarem especificidade à cepa B19 de *Brucella abortus* e ao EPS, estes anticorpos poderiam ser utilizados em testes diagnósticos para brucelose, que visem a detecção de antígeno. Segundo Tini et al. (2002), a IgY pode ser usada em praticamente todos os métodos de imunodiagnóstico tradicionalmente desenvolvidos com IgG de mamíferos, ou seja, imunofluorescência, ELISA, técnicas de imunoeletroforese, Western blotting, imuno-histoquímica, e muitos outros.

3.4 CONCLUSÃO

Estes anticorpos, IgY anti-B19 e IgY anti-EPS, podem ser futuramente utilizados em testes diagnósticos que se baseiam na identificação do antígeno através das interações antígeno-anticorpo, devido à boa resposta desempenhada frente aos antígenos vacina B19 e EPS.

Além disso, os anticorpos IgY anti-B19 podem apresentar melhor resposta na identificação do antígeno em relação aos anticorpos IgY anti-EPS.

REFERÊNCIAS

- BERNARDO, A. R.. **Tecnologia IgY: produção de anticorpos aviários para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o uso ético dos animais de experimentação.** 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.
- CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody: *in vitro* and *in vivo*.** 2002. 53f. Tese (Doutorado em Química Clínica) – Faculdade de Medicina, Uppsala University, Suécia, 2002.
- DAVIS, C.; REEVES, R. **High Value Opportunities From The Chicken Egg.** Kingston: Rural industries research and development corporation, 61p., 2002.
- GASSMANN, M.; et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.4, n.8, p.2528-2532, 1990.
- HUOPALAHTI, R.; FANDINO, R. L.; ANTON, M.; SCHADE, R.. **Bioactive Egg Compounds.** Heidelberg: Springer, 2007. 298p.
- LARSSON, A.; SJÖQUIST, J.. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. **Journal of Immunological methods**, Sweden, v. 108, n. 1-2, p. 205-208, 1988.
- LARSSON, A., SJÖQUIST, J.. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. **Comparative Immunology, Microbiology & Infection Diseases.** Sweden, v. 13, n. 4, p. 199-201, 1990.
- LARSSON, A.; et al. Chicken antibodies: A tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, Sweden, v. 156, n. 1, p. 79-83, 1992.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O.. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária.** 1ª Ed. Campo Grande: Editora Embrapa Gado de Corte, 2001, 360p.
- PICHLER, H.; et al. An enzyme-immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by use of yolk antibodies. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.362, n.1, p.176-177, 1998.

SCHADE, R.; et al. **Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY technology**. Heidelberg: Springer, 2001. 255p.

SCHADE, R.; et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative to Laboratory Animals: ATLA**, Berlin, v. 2, n. 33, p. 129-154, 2005.

SCHMIDT, P.; et al. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunohistochemistry. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.36, n.9, p.661-668, 1989.

SCHNIERING, A.; SCHADE, R.; HIEPE, T. Development of an IgY-based assay for the detection of *Ascaris suum* antigens. **ALTEX**, Berlin, v.13, n.5, p.62-65, 1996.

SOUSA, S. M. M.. **Conjugados fluorescentes produzidos com igy de galinhas hiperimunizadas**. 2008. 47 f. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SOUSA, C. M.. **Produção de Anticorpo IgY de galinhas e IgG de coelhos para análise de auxina e citocininas**. 2008. 61 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

TINI, M.; et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.131, n.3., p.569-574, Mar., 2002.

WRIGHT, P.F.; et al. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique et Technique-Office International. Epiz**. Vienna, Austria. v. 12, n. 2, p. 435-450, 1993.

CAPÍTULO 4 – USO DE IgG BOVINA NO ELISA INDIRETO UTILIZANDO VACINA B19 E EPS COMO ANTÍGENOS

RESUMO – Objetivou-se neste estudo avaliar a resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados e recém-vacinados com a vacina B19 frente aos antígenos EPS e vacina B19 em ELISA indireto. Foram utilizadas 96 amostras de soro sanguíneo, sendo 32 de bovinos naturalmente infectados para brucelose e 32 de bezerras recém-vacinadas com vacina B19 (15, 30, 45 e 60 dias pós-vacinação), sororreagentes aos testes de AAT e 2-ME; e 32 de bovinos não reagentes a brucelose nos testes de AAT e 2-ME. O ELISA indireto com antígeno vacina B19 não conseguiu detectar animais recém-vacinados e naturalmente infectados, apresentando uma baixa concordância e sensibilidade quando comparado com o teste padrão 2-ME. Já o teste de ELISA indireto com o antígeno EPS apresentou excelente concordância com o teste padrão, porém obteve baixa concordância e sensibilidade para animais recém-vacinados, por conseguir diferenciar estes de animais naturalmente infectados, o que não ocorre no teste 2-ME. O teste de ELISA indireto com o antígeno EPS, quando comparado ao teste de ELISA indireto com o antígeno vacina B19 e 2-ME, foi capaz de diferenciar os animais recém-vacinados com 15, 30, 45 e 60 dias pós-vacinação, dos animais naturalmente infectados, tornando o EPS potencial antígeno para ser estudado.

Palavras-chave: Imunoglobulina G. Extrato proteico solúvel. Ensaio imunoenzimático.

CHAPTER 4 – BOVINE IgG IN INDIRECT ELISA USING AS ANTIGENS B19 VACCINE AND EPS

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the humoral immune response of cattle naturally infected and newly vaccinated with B19 vaccine heifers against EPS and B19 vaccine antigens in indirect ELISA. We used a total of 96 blood serum samples, 32 from naturally infected cattle for brucellosis and 32 newly vaccinated with B19 vaccine heifers (15, 30, 45 e 60 days post vaccination) that were seropositive tests for AAT and 2-ME, and 32 cattle no reagents for brucellosis in AAT and 2-ME tests. ELISA with B19 vaccine antigen could not detect animals vaccinated and naturally infected, presenting a low concordance and sensitivity when compared with the pattern test (2-ME). Already the indirect ELISA with the EPS antigen showed excellent agreement with the pattern test, but got low concordance and sensitivity to animals recently vaccinated , because this test could differentiate these from naturally infected animals, which does not occur in 2-ME test. The indirect ELISA with the EPS antigen, compared with indirect ELISA with the B19 vaccine antigen and 2-ME, was able to differentiate the newly vaccinated animals with 15, 30, 45 and 60 days post vaccination, from naturally infected animals, making the EPS a potencial antigen for be studied.

Keywords: G Immunoglobulin. Soluble protein extract. Immunoassays.

4.1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. Produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição mundial, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultuosos (BRASIL, 2006).

No Brasil a doença é endêmica, sendo a sua ocorrência registrada em todo o território brasileiro (PAULIN; FERREIRA NETO, 2002).

O controle da brucelose apóia-se basicamente em ações de vacinação de bezerras e eliminação dos portadores da doença (RIET-CORREA et al., 2001). A eliminação dos portadores da doença só é recomendada com base nos resultados de testes diagnósticos.

Esta doença é prioritária pelo Governo Federal e está incluída no Programa Nacional de Controle e de Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), o qual prevê que, após resultado positivo no diagnóstico para brucelose, o animal deverá ser sacrificado (BRASIL, 2006).

O programa brasileiro prevê o uso sequencial dos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como teste de triagem, sendo os soros com resultado positivo submetidos a confirmação, que pode ser realizada pela combinação da prova de soroaglutinação lenta com a prova do 2-mercaptoetanol ou então pela reação de fixação de complemento (MATHIAS; MEIRELLES, BUCHALA, 2007).

Outros testes podem ser empregados, como o iELISA (ELISA indireto), no qual utiliza-se como antígeno lipopolissacarídeo de *Brucella abortus*, porém, assim como o AAT, este teste possui alta sensibilidade e especificidade menor, por isso muitas reações falso positivas podem ocorrer (BRASIL, 2006). O ELISA indireto (iELISA) é um dos testes recomendados para comércio internacional pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), embora não seja encontrado facilmente no comércio brasileiro.

Nenhum desses testes consegue diferenciar animais vacinados entre 3 e 8 meses de idade e com menos de 24 meses de animal naturalmente infectado, pois, por ser uma amostra lisa de *Brucella abortus*, a vacina B19 induz a formação de alto título de anticorpos específicos contra o polissacarídeo O do LPS, que interfere no teste sorológico diagnóstico da doença (LETESSON et al., 1997; BRASIL, 2006).

O diagnóstico da brucelose é realizado principalmente pela detecção de anticorpos específicos, contudo uma possível estratégia para contornar as reações cruzadas causadas por anticorpos anti-sLPS é desenvolver métodos diagnósticos

baseados em proteínas selecionadas de *Brucella abortus* (KUMAR; TUTEJA; BATRA, 2007), o que poderia possivelmente apresentar um grande avanço na diferenciação de animais infectados de animais vacinados.

Debbbarh et al. (1996) verificaram que um antígeno de proteína citossolúvel parcialmente purificada (CP28) proveniente de *Brucella melitensis* poderia diferenciar ovelhas infectadas de ovelhas vacinadas mostrando que essa proteína não reagia com soros de ovelhas vacinadas e reagia com anticorpos de animais infectados por *Brucella melitensis*.

Visto que, nos capítulos 2 e 3, os anticorpos IgY das galinhas apresentaram eficiente resposta aos antígenos EPS e vacina B19 quando avaliadas em teste de ELISA indireto e que proteínas selecionadas poderiam diferenciar animais infectados de vacinados, objetivou-se neste estudo avaliar e comparar a resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados e recém-vacinados com a vacina B19 frente aos antígenos EPS e vacina B19 em ELISA indireto.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 96 amostras de soro sanguíneo de bovinos, cedidas pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG/MAPA) e Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF-RS). Estas foram previamente testadas em testes diagnósticos de triagem Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e confirmatório 2-Mercaptoetanol (2-ME), conforme Brasil (2006).

Dessas amostras, 32 eram provenientes de bovinos não reagentes a brucelose, 32 eram de bovinos naturalmente infectados sororreagentes aos testes de AAT e 2-ME, e 32 eram de bezerras recém-vacinadas (15, 30, 45 e 60 dias pós-vacinação) e sororreagentes nos testes de AAT e 2-ME.

Os antígenos utilizados para os testes de ELISA indireto foram vacina Brucelina B19 (Amostra lisa da cepa B19 de *Brucella abortus*), produzida pelo laboratório Vallée, com nº de partida 011/12, fabricação em fevereiro/2012 e validade até agosto de/2013 e Extrato Proteico Solúvel (EPS) extraído a partir da vacina.

4.2.1 Padronização do ELISA indireto com antígenos vacina B19 e EPS

Foram utilizadas quatro placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc), duas delas foram sensibilizadas com três concentrações diferentes de EPS, sendo 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL, e as outras duas foram sensibilizadas com três diluições diferentes da vacina B19, sendo 1:100, 1:500 e 1:1000. Os dois antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, pH8,6), colocados nas placas utilizando-se por poço um volume de 50 µL, de acordo com as concentrações ou diluições mapeadas, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado, e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 µL/poço de Tampão fosfato de sódio (PBS 0,01M pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C.

Após bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS e adicionaram-se 50 µL do IgG bovino (anticorpo primário) previamente diluído em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e leite desnatado a 5% (PBSTM), e depois as placas foram levadas a estufa à 37°C por uma hora. Em uma das placas sensibilizadas com a vacina B19, foi colocado, como anticorpos primários, um *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose e um *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bovinos negativos para brucelose, e na outra foi colocado, como anticorpos primários, um *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bezerras recém-vacinadas com vacina B19 (15, 30, 45 e 60 dias pós-vacinação) e um *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bovinos negativos para brucelose, em quatro diluições diferentes, sendo 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, todas adicionadas em duplicata, conforme mostra modelo da Figura 1. Nas placas sensibilizadas com EPS utilizaram-se os mesmos anticorpos que foram utilizados nas placas sensibilizadas com B19 (Figura 1).

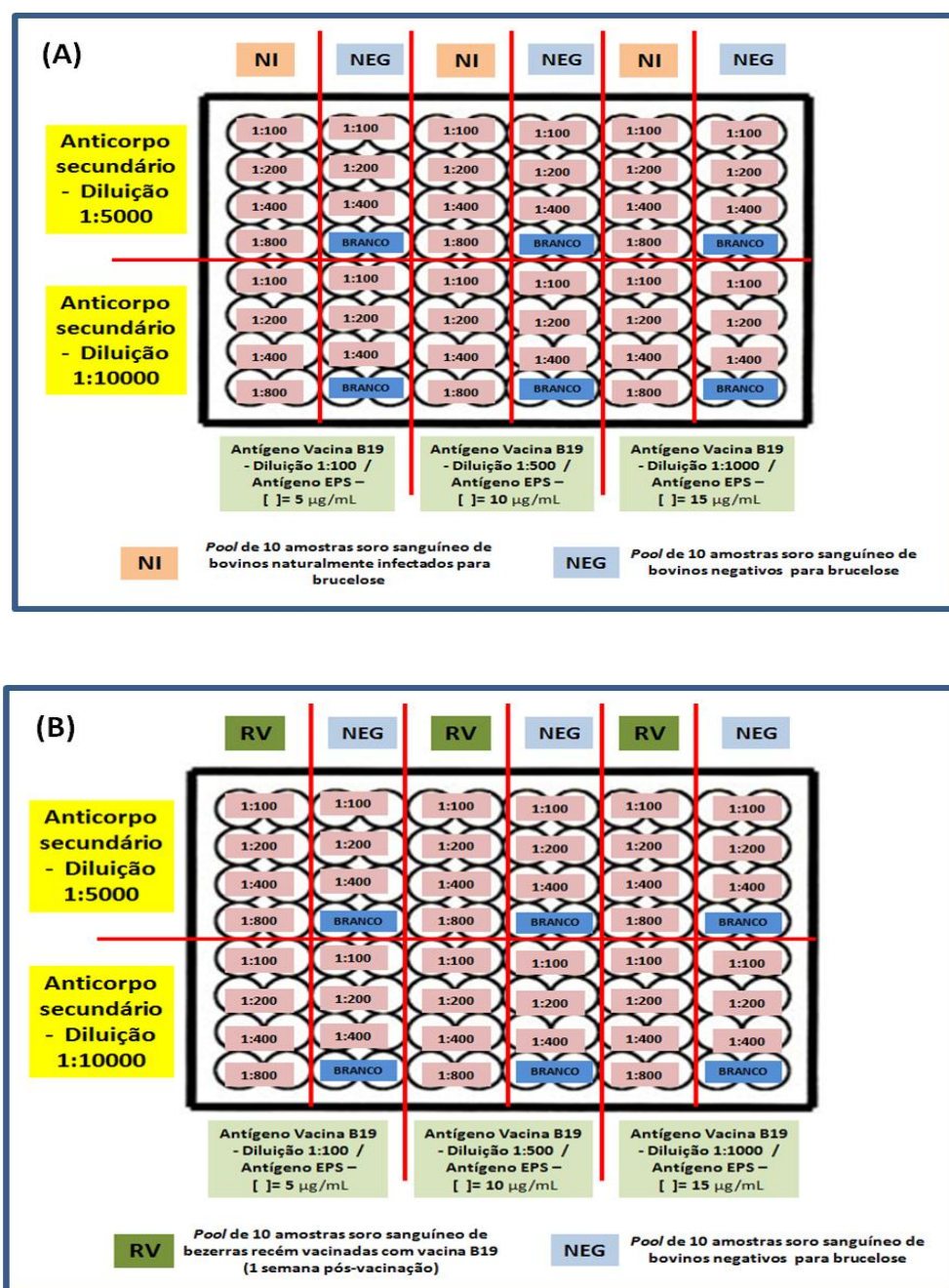
Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 µL/poço do conjugado com anticorpos IgG de coelho anti-IgG bovino conjugado à peroxidase (Sigma), nas diluições de 1:5000 e 1:10000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio. Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa,

que foi mantida sem a exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

O teste de ELISA indireto foi padronizado de acordo com Wright et al. (1993) e Madruga; Araújo; Soares (2001).

As concentrações e diluições ideais foram as que apresentaram a maior diferença em densidade óptica (DO) entre amostras de soro positivas e negativas, e vacinais e negativas.

Figura 1: Modelo da padronização do ELISA indireto de placas sensibilizadas com antígenos vacina B19 e EPS.



Legenda: (A) Placa com anticorpos primários, sendo *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose e *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bovinos negativos para brucelose. (B) Placa com anticorpos primários, sendo *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bezerras recém-vacinadas com vacina B19 (1 semana pós- vacinação) e *pool* de 10 amostras de soro sanguíneo de bovinos negativos para brucelose.

4.2.2 Validação do ELISA indireto com antígenos vacina B19 e EPS

Quatro placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço, sendo duas sensibilizadas com EPS na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, pH8,6) e duas com vacina B19 na diluição de 1:100, e incubadas *overnight* a 4°C por 16 horas. No dia seguinte, o conteúdo das placas foi descartado e as mesmas foram bloqueadas adicionando 300 µL/poço de Tampão fosfato de sódio (PBS 0,01M pH 7,4) acrescido de leite desnatado a 5% (PBSM 5%), incubando-as por duas horas a 37°C. Após incubação, foi realizado um ciclo de três lavagens com tampão PBS.

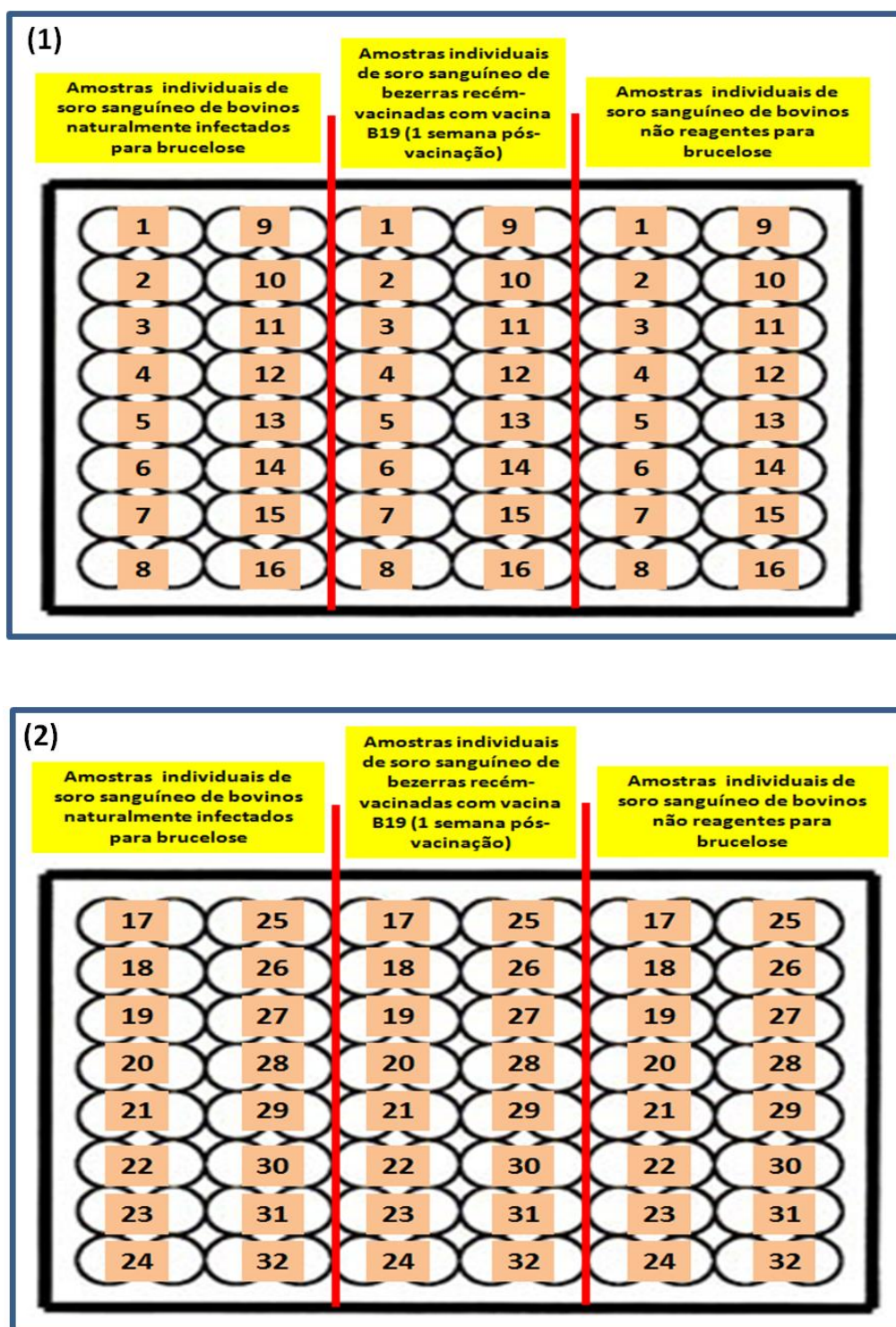
Após incubação com bloqueio e lavagens, foram adicionados as placas 50 µL/poço de anticorpos primários na diluição de 1:100, previamente diluídos em Tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% e leite desnatado a 5% (PBSTM), e as mesmas foram levadas a estufa à 37°C por uma hora. Em cada placa (total de quatro placas), tanto as sensibilizadas com EPS como as sensibilizadas com vacina B19, os anticorpos primários utilizados foram 16 amostras de soro sanguíneo de bovinos negativos para brucelose; 16 amostras provenientes de animais naturalmente infectados sororreagentes aos testes de AAT e 2-ME; e 16 de bezerras recém-vacinadas com vacina B19 (15, 30, 45 e 60 dias pós-vacinação), sororreagentes aos testes de AAT e 2-ME.

Após uma hora de incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio com Tween a 0,05% (PBST 0,05%) e, em seguida, adicionaram-se 50 µL/poço do conjugado com anticorpos IgG de coelho anti-IgG bovino conjugado à peroxidase (Sigma) nas diluições de 1:5000, diluído em PBSTM, e incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão PBST 0,05%. Para revelação da reação diluiu-se uma pastilha de ortofenilenodiamino (OPD, 15mg, Amresco) em 22,5 mL de água MilliQ e 9,75 µL de peróxido de hidrogênio. Adicionaram-se 100 µL dessa solução em cada poço da placa, que foi mantida sem exposição à luz durante 15 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N (25 µL), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate - TP-Reader.

O ponto de corte (*cut-off*) foi calculado pela média da densidade óptica dos controles negativos previamente testados em duplicata somadas a três vezes o desvio padrão desses valores (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), calculado como: $IE = DO_{amostra} / DO_{cut\ off}$, onde as amostras que apresentaram valores de $IE > 1,2$ foram consideradas positivas.

Figura 2: Modelo da validação do ELISA indireto de placas sensibilizadas com antígenos vacina B19 e EPS.



4.2.3 Análise estatística

Os resultados das amostras de IgG bovino testadas pelo método de ELISA indireto com os antígenos vacina B19 e EPS foram distribuídos em uma tabela de contingência 2x2 para o cálculo da sensibilidade e da especificidade relativas (THRUSFIELD, 2004). Nesta tabela, os resultados foram comparados com os resultados do teste 2-ME (teste padrão ouro). Todas as amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose e bezerras recém-vacinadas com vacina B19, foram consideradas reagentes a este teste.

Para determinar a concordância entre os testes realizados e o teste padrão, calculou-se também o índice *Kappa*, segundo interpretação de Rosner (2006), utilizando o programa Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

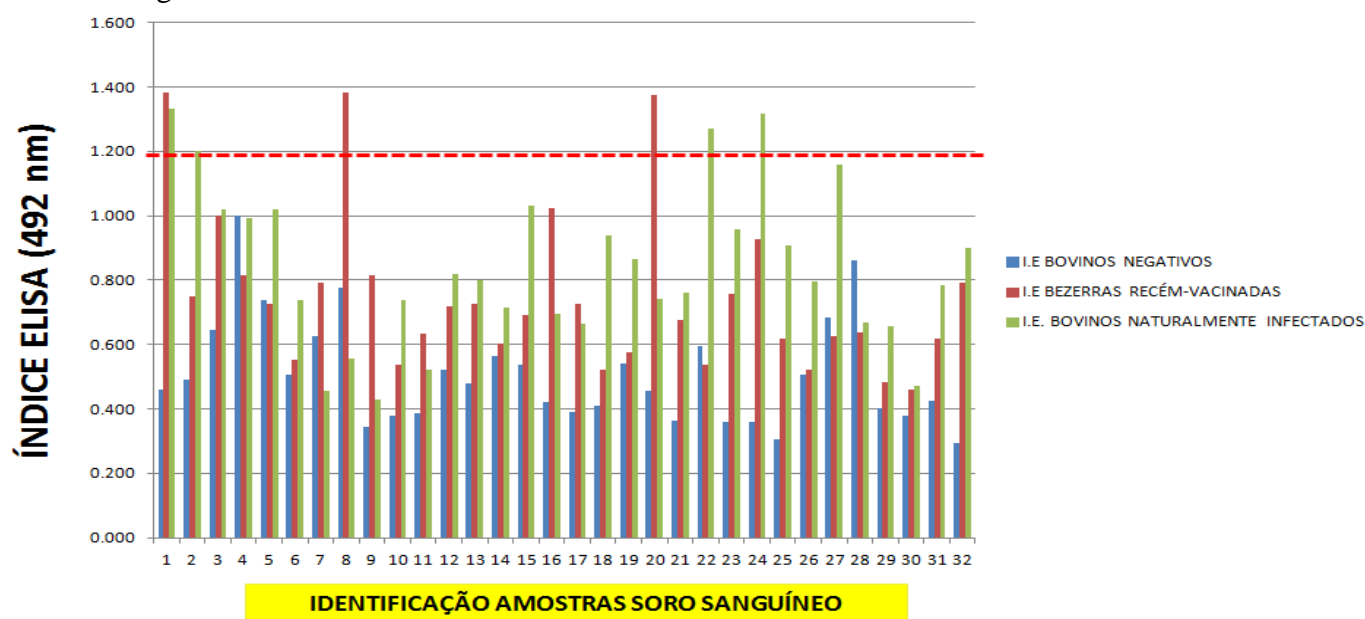
Na padronização do teste obteve-se um protocolo capaz de discriminar *pool* de amostras de soro sanguíneo de bovinos positivos, negativos e recém-vacinados, nas placas sensibilizadas com B19, o que não ocorreu na placa sensibilizada com EPS, uma vez que houve a diferenciação entre o *pool* de amostras de soro sanguíneo de bovinos positivos e negativos, porém não houve diferença entre as absorbâncias do *pool* de amostras de soro sanguíneo de bovinos recém-vacinados e negativos.

No entanto, como a melhor resposta encontrada na maioria das placas foi da diluição 1:100 do antígeno vacina B19 e na concentração de 10 µg/mL do antígeno EPS, e na diluição de anticorpos primários e secundários de 1:100 e 1:5000, respectivamente, estes protocolos para diferentes antígenos foram aplicados na validação.

Na validação do ELISA indireto, o *cut off* obtido para a placa sensibilizada com EPS foi de 0,322, já o obtido para a placa sensibilizada com vacina B19 foi de 0,300. As amostras consideradas positivas foram as que obtiveram índice ELISA (IE) >1,2.

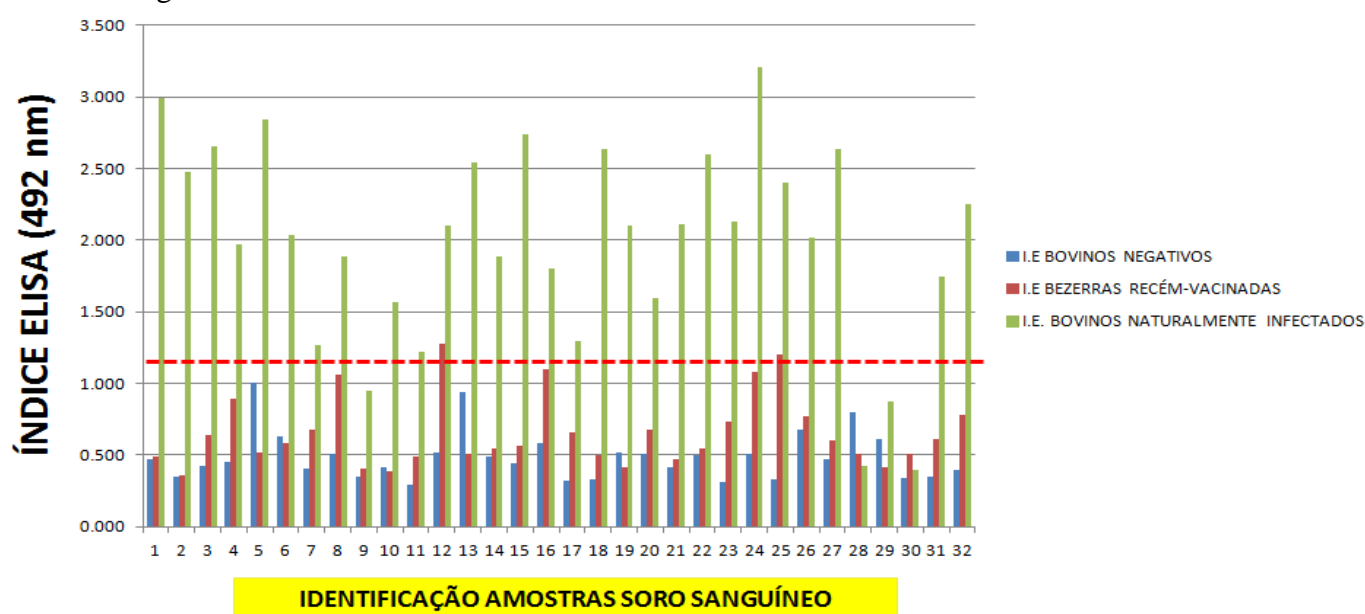
Nas placas sensibilizadas com a vacina B19, conforme a Figura 3, das 32 amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados, apenas quatro foram consideradas positivas. Já para as 32 amostras de soro sanguíneo de bezerras recém-vacinadas com vacina B19, apenas três foram consideradas positivas.

Figura 3: Resultados da validação ELISA indireto das placas sensibilizadas com o antígeno vacina B19.



Nas placas sensibilizadas com o antígeno EPS, das 32 amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose, 28 foram consideradas positivas, de acordo com a Figura 4, e das 32 amostras de soro sanguíneo de bezerras recém-vacinadas com vacina B19, apenas duas amostras foram consideradas positivas.

Figura 4: Resultados da validação ELISA indireto das placas sensibilizadas com o antígeno EPS.



Analisando a sensibilidade e a especificidade dos ELISAs indiretos para diferentes antígenos, bem como a concordância desses testes comparando com o teste padrão 2-ME, pode-se observar que o teste de ELISA indireto com o antígeno vacina B19 para amostras de animais recém-vacinados apresentou uma concordância fraca com o teste padrão de 54,69% e índice de *kappa* de 0,0938, e sensibilidade e especificidade de 9,38% e 100,00%, respectivamente. Para animais naturalmente infectados, a concordância observada também foi fraca, sendo de 56,25%, com o índice de *kappa* de 0,125, e sensibilidade e especificidade de 12,50% e 100,00%, respectivamente, conforme Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno vacina B19 para amostras de soro sanguíneo de fêmeas bovinas recém-vacinadas com vacina B19 frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto VACINA B19 (AMOSTRAS RECÉM-VACINADOS)	2-ME		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	3	0	3
NEGATIVO	29	32	61
TOTAL	32	32	64

Sensibilidade= 9,38%; Especificidade= 100,00%; Concordância= 54,69%; *Kappa*= 0,0938

Tabela 2: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno vacina B19 para amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto VACINA B19 (AMOSTRAS NATURALMENTE INFECTADOS)	2-ME		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	4	0	4
NEGATIVO	28	32	60
TOTAL	32	32	64

Sensibilidade= 12,50%; Especificidade= 100,00%; Concordância= 56,25%; *Kappa*= 0,125

O teste ELISA indireto com antígeno vacina B19 não foi capaz de diferenciar fêmeas bovinas recém-vacinadas contra brucelose (vacina B19) de bovinos

naturalmente infectados, isso ocorreu, porque esse teste não conseguiu detectar animais naturalmente infectados, por esse motivo, apresentou uma baixa sensibilidade e concordância em relação ao teste 2-ME, que detecta como positivos animais recém-vacinados e naturalmente infectados, não conseguindo fazer a diferenciação entre eles.

A especificidade foi alta (100,00%), isso se deve ao fato de que 32 amostras foram negativas ao teste ELISA indireto com antígeno vacina B19 e ao teste 2-ME ao mesmo tempo, tendo em vista que o cálculo da especificidade é feito pelo total de amostras negativas aos dois testes ao mesmo tempo dividido pelo total de amostras negativas do teste padrão de acordo com a tabela de contingência.

A resposta humoral de bovinos infectados por *Brucella abortus* ou vacinados com B19 caracteriza-se pela síntese dos quatro isotipos principais de imunoglobulinas. A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação produz-se a partir da primeira semana, aparecendo, em primeiro lugar, o isotipo IgM, detectadas entre cinco a sete dias após a vacinação, com pico entre 13 e 21 dias. Depois sua concentração diminui, mas não desaparece por vários meses. As IgG1 se formam logo após, entre os 14 e 21 dias após a vacinação, com a máxima concentração em 28 e 42 dias. As respostas de IgG2 e IgA aparecem mais tarde, aumentam gradativamente, mas permanecem em níveis baixos. A observação por períodos prolongados da resposta humoral em animais infectados demonstra que há um leve decréscimo dos níveis de IgM, enquanto os de IgG1 permanecem altos, inalterados. A IgG2 e IgA permanecem em níveis mais baixos e estáveis (OLASCOAGA, 1976; BRASIL, 2006).

Nesse contexto, acredita-se que o anticorpo IgG bovino tanto para animais infectados como para animais recém-vacinados tenha baixa especificidade frente ao antígeno vacina B19.

O teste de ELISA indireto com antígeno LPS de *Brucella abortus*, também considerado oficial, mas pouco utilizado no Brasil, é altamente sensível, porém não é capaz de diferenciar anticorpos resultantes de vacinação com vacina B19 daqueles induzidos por cepas patogênicas (OIE, 2000).

Ao contrário deste teste, o ELISA indireto utilizado neste estudo, mostrou baixa sensibilidade, não sendo capaz de detectar com eficiência animais naturalmente infectados, além de não detectar animais recém-vacinados. Acredita-se que o antígeno B19, por ser um antígeno total e não solúvel, possui baixa interação com o anticorpo, não sendo detectada a ligação antígeno-anticorpo no teste de ELISA indireto.

Ao analisar o teste ELISA indireto com o antígeno EPS, pode-se observar que ele foi capaz de diferenciar animais naturalmente infectados de recém-vacinados. Tal fato pode ser visto de acordo com os valores de sensibilidade, especificidade e concordância, nas Tabelas 3 e 4. O ELISA indireto com antígeno EPS para bovinos naturalmente infectados apresentou concordância excelente (93,75%) com o teste padrão (2-ME), com alta sensibilidade (87,50%) e alta especificidade (100%), já que foi capaz de detectar grande parte dos animais positivos detectados no teste 2-ME. Já para animais recém-vacinados, este teste, quando comparado ao teste padrão, apresentou fraca concordância (53,13%), bem como baixa sensibilidade (6,25%), isso se deve ao fato desse teste não conseguir detectar animais recém-vacinados, ao contrário do teste padrão, que consegue detectá-los, apresentando desta forma uma baixa concordância com o teste de ELISA com antígeno EPS para animais recém-vacinados.

Tabela 3: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno EPS para amostras de soro sanguíneo de fêmeas bovinas recém-vacinadas com vacina B19 frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto EPS (AMOSTRAS RECÉM-VACINADOS)	2-ME		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	2	0	2
NEGATIVO	30	32	62
TOTAL	32	32	64

Sensibilidade= 6,25%; Especificidade= 100,00%; Concordância= 53,13%; *Kappa*= 0,0625

Tabela 4: Tabela de contingência comparando os resultados do ELISA indireto com o antígeno EPS para amostras de soro sanguíneo de bovinos naturalmente infectados para brucelose frente ao teste padrão 2-ME no diagnóstico de brucelose, com determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância.

ELISA indireto EPS (AMOSTRAS NATURALMENTE INFECTADOS)	2-ME		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	28	0	28
NEGATIVO	4	32	36
TOTAL	32	32	64

Sensibilidade= 87,50%; Especificidade= 100,00%; Concordância= 93,75%; *Kappa*= 0,8750

Um dos pontos mais preocupantes no uso da vacina B19 é a persistência de anticorpos sorológicos pós-vacinais, o que gera muitos resultados falso-positivos nas provas sorológicas hoje utilizadas, sendo difícil distinguir anticorpos de infecção daqueles resultantes da vacinação (KOLODA, 2005).

Para ser um bom teste diagnóstico, ele deve ter alta sensibilidade e especificidade, ou seja, capaz de detectar verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, segundo Thrusfield (2004). Neste estudo, o teste de ELISA indireto com antígeno vacina B19 quando comparado com o padrão (2-ME), não apresentou requisitos para ser um bom teste, pois não conseguiu detectar animais naturalmente infectados e recém-vacinados, apresentando uma baixa concordância com o teste 2-ME, além de baixa sensibilidade. Em contrapartida o ELISA indireto com o antígeno EPS mostrou ser uma excelente ferramenta para um futuro diagnóstico, uma vez que este apresentou altos valores de sensibilidade e especificidade e uma excelente concordância com o teste padrão (2-ME) para animais naturalmente infectados, além de ser capaz de diferenciar animais recém-vacinados de naturalmente infectados, o que faz desse teste uma importante descoberta, visto que sacrifício obrigatório dos animais reagentes para brucelose em testes oficiais é uma grande preocupação atualmente.

4.4 – CONCLUSÃO

O ELISA indireto com o antígeno EPS, quando comparado ao testes ELISA indireto com o antígeno vacina B19 e 2-ME, foi capaz de diferenciar os animais recém-vacinados dos animais naturalmente infectados, demonstrando o potencial do EPS como antígeno para diagnóstico da brucelose bovina.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; et al. **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. ONG Mamiraua. Belém, PA, 2007.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**: legislação. Brasília, DF:188p., 2006.
- DEBBARH, H. S-A.; et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Partially Purified Cytosoluble 28-Kilodalton Protein for Serological Differentiation between *Brucella melitensis*-Infected and *B. melitensis* Rev.1-Vaccinated Sheep. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Nouzilly, v. 3, n. 3, p. 305-308, 1996.
- KOLODA, M.. **Cinética de produção de anticorpos em bezerras imunizadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* (Frederick Bang, 1987)**, 2005, 56f.. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2005.
- KUMAR, S.; TUTEJA, U.; BATRA, H. V.. Generation and characterization of murine monoclonal antibodies to recombinant 26 Kda periplasmic protein of *Brucella abortus*. **Hybridoma**, Karnataka, v. 26, n. 5, p. 322-327, 2007.
- LETESSON, J. J.; et al. Humoral immune responses of Brucella-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant Brucella proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Namur, v. 4, n. 5, p. 556–564, 1997.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O.. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Editora Embrapa Gado de Corte, 2001, 360p.
- MATHIAS L. A.; MEIRELLES R. B.; BUCHALA F.. Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p. 18 -22, 2007.
- OIE. Escritório Internacional de Epizootias. **Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines. Bovine Brucellosis**. 4th edition. Chapter 2.3.1. 2000. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00048.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

OLASCOAGA, R.C., Diagnóstico serológico de la brucelosis, **Zoonosis**, Buenos Aires, v. 18, n. 3/4, p. 101-141, 1976.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 105-112, Jun. 2002.

RIET-CORREA F.; SCHILD A. L.; MÉNDEZ M. C.; LEMOS R. A. A.. **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Editora Varela, 2001, 574p.

ROSNER, B. . **Fundamentals of Biostatistics**. 6 ed. Boston: Duxbury Press, 2006.

THRUSFIELD, M.. Testes de diagnósticos. Em: **Epidemiologia veterinária**. 2.ed. p. 323-346. Editora Roca. São Paulo, São Paulo, 2004.

WHO. World organization for animal health. **Bovine Brucellosis**. Em: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), v. 2 (Chapter 2.4.3), p. 15, 2009.

WRIGHT, P. F.; et al. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue scientifique et technique de l'office international des epizooties**. Vienna, v.12, n. 2, p. 435-450, 1993.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Galinhas imunizadas com a vacina B19 e com EPS de *Brucella abortus* produziram anticorpos IgY reativos a cada um desses antígenos, detectáveis por teste ELISA indireto. Esta produção foi baixa, após a primeira imunização, portanto foram necessárias outras imunizações para que a produção de anticorpos fosse maior.
- A produção de anticorpos IgY anti-B19 foi maior em relação à produção de IgY anti-EPS, sendo o antígeno B19 mais eficiente na indução de IgY em galinhas.
- Anticorpos IgY anti-B19 e IgY anti-EPS, por reagirem bem aos dois antígenos, B19 e EPS, foram considerados potenciais ferramentas para serem utilizados em diagnósticos que visam a detecção do antígeno, através da interação antígeno-anticorpo.
- Os anticorpos IgG produzidos em bezerras recém-vacinadas com vacina B19 não reagiram no teste ELISA indireto com os antígenos vacina B19 e EPS.
- Diante dos resultados obtidos, acredita-se que os anticorpos IgY (produzidos por aves inoculadas) sejam mais específicos que os IgG de bovinos, podendo ser úteis nos testes diagnósticos que visem a detecção do antígeno para o diagnóstico brucelose.
- O EPS mostrou ser um potencial antígeno para ser utilizado em testes diagnósticos.

ANEXOS

ANEXO A - Protocolo de aprovação do Comitê de Ética na Utilização de animais (CEUA).



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 071/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 044/12

Projeto Pesquisa: “Produção e aplicação de igr obtido a partir de imunizações de galinhas com extrato proteico e antígeno total de *brucella abortus*, *leptospira interrogans* e vírus da anemia infecciosa equina.”

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

.

Uberlândia, 16 de Agosto de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU

ANEXO B – Preparo das soluções utilizadas no experimento

Soluções para eletroforese em Gel Poliacrilamida

- **Tampão de corrida para SDS-PAGE (5X)**

Tris base	125 mM
Glicina	125 mM
SDS	0,5
pH 9,2	

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 2X**

Tris-HCl pH 6,8	100 mM
SDS	4% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
B-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,2% (p/v)

- **Acrilamida 49%/Bis-acrilamida 0.5%**

Acrilamida	98 g
Bis-acrilamida	1 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL
Estocada na geladeira, ao abrigo de luz	

- **Tris-HCl 3 M, pH 8,3**

Tris	72,68 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

- **Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8**

Tris	12,11g
H ₂ O q.s.p.	200 ML

- **SDS 10% (p/v)**

SDS	10 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

- **PSA 10% (p/v)**

Persulfato de amônio	100 mg/1 mL de água
----------------------	---------------------

- **Gel de empilhamento SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	10,41 mL
Tris-HCl pH 8,3	3,75 mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	1,50 mL
PSA 10% (p/v)	140 µL
TEMED	10 µL

- **Gel de separação SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	5,90 mL
Tris-HCl pH 8,3	13,35 mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	13,25 mL
Glicerol	7,48 mL
PSA 10% (p/v)	140 µL
TEMED	7 µL

- **Solução corante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)
<i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250)	1% (p/v)

- **Solução descorante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Soluções para ELISA indireto

- **Tampão Bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,6**

Bicarbonato de sódio 420 mg

H₂O destilada 90 mL

O pH foi ajustado para 8,6

O volume final foi completado para 100 mL.

- **PBS pH 7,4**

137mM NaCl 10X Estoque: 80g de NaCl

2,7mM KCl 2,0g de KCl

12mM Na₂HPO₄ 17,0g de Na₂HPO₄

1,2mM KH₂PO₄ 1,63g de KH₂PO₄

Ajustar pH a 7,4 com HCl

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

- **PBS 1X**

Diluir solução estoque PBS 10X, colocando 100 mL de PBS 10X e completando o volume com H₂O MilliQ ou destilada para 1000 mL.

- **PBST 0,05% (tampão de lavagem)**

PBS 1X adicionado de 0,05% (v/v) de Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) – Sigma

- **PBSM – PBS 1X + Leite em pó desnatado (Molico) 5%**

PBS 1X adicionado de leite em pó desnatado (Molico) a 5% (p/v)

- **PBSTM – PBS 1X + Leite em pó desnatado (Molico) 5% + Tween (Sigma) 0,05%**

PBS 1X adicionado de leite em pó desnatado (Molico) a 5% (p/v) + 0,05% (v/v) de Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) – Sigma