



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEONARDO PINTO MEDEIROS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA TOXINA SHIGA DE  
*Escherichia coli***

---

Londrina  
2020

LEONARDO PINTO MEDEIROS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA TOXINA SHIGA DE  
*Escherichia coli***

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M488p Medeiros, Leonardo Pinto.  
Produção e caracterização de imunoglobulinas Y contra toxina Shiga de *Escherichia coli* / Leonardo Pinto Medeiros. - Londrina, 2020.  
47 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.  
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* - Tese. 2. STEC - Tese. 3. Toxina Shiga - Tese. 4. IgY - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.  
CDU 579

LEONARDO PINTO MEDEIROS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
IMUNOGLOBULINAS Y CONTRA TOXINA SHIGA DE  
*Escherichia coli***

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Juan Josue Puño Sarmiento  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luís Eduardo De Souza Gazal  
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama  
Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Robert Alvin Bernedo Navarro  
VIB-UGent Center for Medical Biotechnology

Londrina, 31 de agosto de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela confiança depositada em mim, por sua paciência, por seus conhecimentos e conselhos transmitidos durante o mestrado. Agradeço por sua dedicação, pela amizade e pelo exemplo que é dentro e fora do laboratório.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Renata Kobayashi, também pela confiança, por toda atenção, dedicação e carinho que tem conosco dentro do laboratório, pelos conselhos e experiências transmitidos.

Ao Dr. Robert Alvin Bernedo Navarro, por ter aceitado participar da banca examinadora, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos, e pela calorosa e amigável acolhida em Campinas e na UNICAMP.

Ao Dr. Juan Josue Puño Sarmiento e Dr. Luís Eduardo De Souza Gazal, por terem aceitado participar da banca examinadora, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade de longa data, e pelos Chopps Colina pagos.

À Juliana e ao Prof. Emerson Venâncio, pela ajuda nos experimentos, companheirismo e amizade durante esse período.

Aos meus pais e irmão que sempre me incentivaram, me deram forças e me apoiaram nesta jornada. Agradeço por toda a compreensão e carinho que tiveram comigo.

À Miriam, pelo companheirismo, paciência, carinho e por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do NIP 3, que me aguentaram todos esses anos no laboratório, compartilharam experiências e conhecimento, e por todo carinho. Agradeço por todos os momentos que passamos no laboratório e por toda a amizade.

Aos laboratórios: de Virologia, pelo fornecimento das culturas de células, ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Laboratório de Micologia Médica e Laboratório de Ecologia Microbiana pelo fornecimento de equipamentos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos conhecimentos transmitidos contribuindo para minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela minha bolsa de 3 anos, que ajudou e muito no começo do trabalho.

Àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

***Muito Obrigado!***

**“Parecido é uma coisa, igual é diferente”**

**- NAKAZATO, G., 2015.**

MEDEIROS, Leonardo Pinto. **Produção e caracterização de imunoglobulinas Y contra toxina Shiga de *Escherichia coli***. 2020. 47 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR, 2020.

## RESUMO

*Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) é um patógeno de veiculação alimentar com grande significância na saúde pública humana e com grandes impactos econômicos. Vários surtos de Síndrome Hemolítica Urêmica causada por STEC têm ocorrido no mundo todo, porém no Brasil essas infecções são ocasionais e não associadas a surtos. As toxinas Shiga (Stx) são os principais fatores de virulência de STEC, e muitas vezes são utilizadas como antígeno para diagnóstico da presença desse patótipo. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi produzir anticorpos IgY em galinhas poedeiras contra Stx utilizando como antígeno a subunidade B recombinante da Stx do tipo 2 (rStx2aB), e avaliar sua reatividade para uma possível aplicação em diagnósticos e imunoprofilaxia. O rendimento médio de extração de proteína total nas gemas foi de 5,2 mg por mL de gema, totalizando cerca de 41,6 mg de IgY por ovo. Uma alta titulação de anticorpos contra rStx2aB nos anticorpos IgY purificados dos ovos foi observada cerca de 35 dias após a primeira imunização, com aumento considerável após a 8ª semana e mantendo-se estável até a 15ª semana. Além disso, o IgY purificado anti-Stx2B pode neutralizar efetivamente a atividade citotóxica de sobrenadante da cepa STEC O157:H7 86-24 em células Vero. Nosso trabalho demonstra que a subunidade B recombinante da Stx2a representa uma boa alternativa para gerar anticorpos IgY específicos, os quais possuem um grande potencial para serem aplicados em diagnósticos e profilaxia de STEC.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; STEC; toxina Shiga; IgY.

MEDEIROS, Leonardo Pinto. **Production and characterization of Y immunoglobulins against *Escherichia coli* Shiga toxin.** 2020. 47 p. Thesis (PhD in Microbiology) – State University of Londrina. Londrina – PR, 2020.

## ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a foodborne pathogen with great public health and economic impacts. Several outbreaks of Hemolytic Uremic Syndrome caused by STEC have occurred worldwide, however in Brazil these infections are occasional and not outbreak associated. Shiga toxins (Stx) are the main STEC virulence factors and are often used as an antigen to this pathotype detection. Thus, the work objective was to produce IgY against Stx in laying hens using the recombinant Stx2 B subunit (rStx2aB) as antigen and evaluate its reactivity for a possible diagnostics and prophylaxis application. The average yolk protein yield after extraction was 5.2 mg per mL/yolk, approximately 41.6 mg of IgY per egg. A high specific IgY response against rStx2aB was observed about 35 days after the first immunization, increasing even more after the 8th week and remained stable until the 15th week. In addition, purified anti-Stx2aB IgY can neutralize STEC O157: H7 86-24 supernatant cytotoxic activity in Vero cells. Our work demonstrates that rStx2aB utilization represents a good alternative to specific IgY generation against Stx, which have great diagnostics and prophylaxis application potential for STEC.

**Keywords:** *Escherichia coli*; STEC; Shiga toxin; IgY.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	11
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga.....	12
1.2	IMUNOGLOBULINAS Y (IGY).....	17
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	27
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>ANEXOS</b> .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é composto de cinco espécies (*Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*) (GARRITY; BELL; LILBURN, 2005), sendo a espécie *E. coli* a mais estudada mundialmente, devido à sua maior ocorrência e sua diversidade genética abundante, abrangendo cepas comensais e patogênicas com os mais diferentes tipos de metabolismos e aplicações (BAESHEN et al., 2015; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RODRIGUES; RODRIGUES, 2018).

Em 1885, o bacteriologista alemão Theodore Escherich descreveu pela primeira vez a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, que era então chamada de "*Bacterium coli comune*". *E. coli* é um bastonete anaeróbio facultativo comumente encontrado como componente de microbiota intestinal humana e de outros animais (GARRITY; BELL; LILBURN, 2005). Entretanto, mesmo que a maioria das cepas de *E. coli* sejam comensais, algumas cepas podem ser patogênicas, provocando infecções no trato urinário, sepse, meningite e doenças diarreicas (KAPER 2004). Cepas de *E. coli* patogênicas relacionadas com infecções extraintestinais são denominadas *E. coli* Patogênia Extraintestinal (ExPEC) (BIRAN; RON, 2018). Já cepas de *E. coli* relacionadas às infecções intestinais, tanto em humanos como em outros animais, são denominadas *E. coli* Diarreio gênica (DEC) (GOMES et al., 2016).

As DEC são um dos grupos mais importantes de agentes etiológicos nas doenças diarreicas, no qual um conjunto de fatores de virulência e características, obtidos principalmente por transferência horizontal de genes, favorecem sua persistência e colonização no hospedeiro (CROXEN et al., 2013). Deste modo, as DEC são classificadas em cinco patotipos clássicos, baseados nos mecanismos de patogenicidade, manifestações clínicas e fatores de virulência. Esses patotipos são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* produtora de Shiga-Toxinas (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (GOMES et al., 2016).

### 1.1.1. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Entre as patogênicas, as cepas de (STEC) são um dos principais agentes etiológicos de Doenças transmitidas por alimentos (DTAs), com grande significância na saúde pública humana, acarretando cerca de 120 mortes e deixando mais de 1 milhão de pessoas doentes anualmente (FAO/WHO, 2019). Além dos problemas de saúde pública, os danos econômicos causados por esse patótipo são de grande importância, quando somado as perdas no agronegócio (proibição de venda e recolhimento de alimentos contaminados) e saúde pública (hospitalizações, tratamentos, sequelas e óbitos), causando mais 700 milhões de dólares em prejuízos anualmente, somente nos Estados Unidos, segundo uma estimativa de Scharff, 2012. Infecções intestinais associadas à esse patótipo podem variar desde uma diarreia leve e colite hemorrágica até síndrome hemolítico-urêmica (SHU), uma doença grave com grande potencial de letalidade (LEE; TESH, 2019). A SHU causada por infecção de STEC são as mais frequentemente encontradas, manifestando-se aproximadamente uma semana após o contato e ingestão do patógeno, sendo caracterizada por uma disfunção renal aguda, anemia hemolítica micro-angiopática não imune e trombocitopenia (MELE; REMUZZI; NORIS, 2014; TARR; GORDON; CHANDLER, 2005).

A principal característica de STEC é a produção de uma potente citotoxina que inibe a síntese proteica em células eucarióticas, inativando a subunidade 60S dos ribossomos. Como essas citotoxinas possuem uma alta atividade em células Vero (célula de rim de macaco verde africano), elas foram denominadas primeiramente como verotoxinas (VT) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977). Devido a diversos estudos após sua descoberta, outra nomenclatura começou a ser empregada, a de toxina semelhante a toxina Shiga (SLT) após a identificação de similaridades com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 (O'BRIEN et al., 1982). A partir desse momento, ambas as nomenclaturas eram utilizadas, gerando uma grande confusão, principalmente após o reconhecimento que existiam dois tipos principais de VT/SLT (SLT-I e SLT-II ou VT1 e VT2), além de suas variantes. Deste modo, para evitar maiores confusões, Calderwood et al. (1996) propuseram que todas essas toxinas fossem chamadas de toxinas Shiga (Stx), uma

vez que possuem um alto grau de similaridade, pertencendo então a uma única família, a família de toxinas Shiga. Esta proposta foi bem aceita pela comunidade científica, entretanto as nomenclaturas anteriores ainda são encontradas hoje em dia.

A Stx é uma toxina proteica (codificada pelo gene *stx*) pertencente a família AB5, a qual possui outras toxinas de relevância na saúde humana, como a toxina colérica, toxina pertussis e enterotoxina termo-lábil de ETEC (BEDDOE et al., 2010). Por ser dessa família de toxinas, a Stx é composta por um monômero de subunidade A (aproximadamente 32 kDa) e por um pentâmero de subunidade B (aproximadamente 8 kDa cada monômero). A subunidade A possui a função enzimática da toxina, já a subunidade B é responsável pela ligação da Stx nos receptores das células dos hospedeiros, possuindo cerca de 15 potenciais locais de ligação aos receptores, 3 para cada monômero de subunidade B (BRYAN; YOUNGSTER; MCADAM, 2015).

Nos primeiros estudos realizados para descrever as toxinas produzidas por STEC, foram revelados que essas toxinas possuem dois tipos, as toxina Shiga tipo 1 (Stx1) e as toxinas Shiga tipo 2 (Stx2), sendo a Stx1 extremamente semelhante à Stx produzida por *S. dysenteriae* sorotipo 1. De forma geral, a Stx2, possui cerca de 56% de semelhança na sequência de aminoácidos comparado com a Stx1, entretanto os domínios responsáveis pela ligação nas células do hospedeiro e de atividade enzimática são altamente conservados. Atualmente, são conhecidos ainda variantes genéticas dessa toxinas, sendo que a Stx1 possui 3 variantes genéticas (Stx1a, Stx1c e Stx1d) e a Stx2 possui 7 variantes genéticas (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g) bem definidas (LEE; TESH, 2019). As diferenças em subtipos e variantes das Stx estão associadas aos diferentes níveis de citotoxicidade e quadros de sintomas e agravos da infecção por STEC. As variantes Stx2a, Stx2c ou Stx2d são mais associadas com quadros de colite hemorrágica e SHU em comparação com as demais variantes de Stx (Stx1, Stx2e, Stx2f e Stx2g) que estão associadas com quadros de diarreia menos graves, sendo incomuns em casos de infecção humana por STEC (GOMES et al., 2016).

Em seu mecanismo de ação, as Stx entram em contato com as células alvo principalmente pelos receptores de superfície da família globotriaosilceramida, principalmente o Gb3, com exceção das variantes Stx2e que possuem uma preferência pelo receptor Gb4. Uma vez que a toxina se liga ao seu receptor, inicia-

se o processo de internalização por endocitose dependente de claritina. Essa vesículas contendo Stx são transportadas internamente na célula via complexo de Golgi até o retículo endoplasmático, antes de serem translocadas para o citosol. Durante o transporte das Stx, a subunidade A é clivada em A1 e A2 pela ação enzimática da furina, entretanto, A1 e A2 permanecem ligadas por ligações dissulfeto até a chegada no retículo endoplasmático, onde essa ligação é quebrada e a porção A1 é translocada ao citosol. A fração A1 apresenta atividade de RNA N-glicosidade, modificando irreversivelmente o RNA ribossomal, levando a uma interrupção da síntese proteica e subsequente morte celular (LEE; TESH, 2019).

Além da produção de Stx, um subgrupo de STEC, as denominadas enterohemorrágicas (EHEC), possuem a capacidade de causar lesões “*Attaching and Effacing*” (A/E), que é uma característica da patogênese de EPEC, sendo que a região gênica responsável pela lesão A/E são encontrados na ilha de patogenicidade LEE (*Locus for Enterocyte Effacing*). Essas lesões são caracterizadas pela aderência íntima da bactéria na superfície dos enterócitos do hospedeiros, levando à uma destruição das microvilosidades intestinais e formação de estruturas celulares semelhantes à pedestais (STEVENS; FRANKEL, 2014). Embora exista uma alta associação de EHEC com casos de colite hemorrágica e SHU em vários países, a presença dessa região gênica não é uma condição necessária para causar quadros clínicos mais graves por infecções de STEC, pois existem cepas LEE-negativas que também já foram associadas com surtos e casos esporádicos de SHU (BIELASZEWSKA et al., 2011).

A infecção por STEC incia-se na ingestão de água e/ou alimentos contaminados, sendo que para iniciar a infecção, é necessário, geralmente, um número baixo (10 – 100) de unidade formadores de colônias (UFC) (NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Entretanto, com a análise de diversos surtos por STEC, a quantidade necessária para iniciar-se a infecção é variada, pois acaba levando em consideração não apenas a carga microbiana inicial, mas também as características de cada cepa de STEC e da susceptibilidade do hospedeiros (TEUNIS; OGDEN; STRACHAN, 2008). Um dos fatores que possuem grande influência na infectividade das cepas de STEC, é a resistência a alta acidez do suco gástrico, envolvendo diversos mecanismos para essa sobrevivência (KING et al., 2010). Um desse mecanismos é através da ativação de chaperonas presentes no periplasma de cepas de EHEC, que quando ativadas devido ao pH ácido do meio circundante,

previne a agregação de proteína induzida por ácido e facilita o redobramento de proteínas após a neutralização do pH (HONG et al., 2012). Após sobreviver ao pH ácido, STEC chega na mucosa intestinal e utiliza de diversos *pilus* e fímbrias para começar a colonização. Em cepas de EHEC, essa colonização é promovida pela ativação da região LEE, e produção de diversos fatores que ajudam na colonização iniciação e posterior adesão A/E (FARFAN; TORRES, 2012). Uma vez aderida na mucosa intestinal, cepas de STEC começam a produzir Stx, e uma vez translocado para a lâmina própria intestinal, essas toxinas induzem a expressão de quimiocinas pelas células epiteliais, levando ao aumento da permeabilidade vascular e consequentemente o extravasamento de leucócitos. Entretanto, com o aumento da permeabilidade celular, acredita-se que isso facilita a entrada de Stx na corrente sanguínea (BÉKÁSSY et al., 2011).

Mesmo com relatos de STEC desde a década de 70, esses patógenos começaram a ganhar maior destaque apenas a partir de surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos em 1982 (RILEY et al., 1983), fazendo com que STEC passasse a ter uma maior relevância na saúde pública, uma vez que foi responsável por diversos surtos associados ao consumo de água e alimentos contaminados, inclusive com casos fatais (BRYAN; YOUNGSTER; MCADAM, 2015).

Embora mais de 400 sorotipos diferentes de STEC já tenham sido identificado (BLANCO et al., 2004), o sorotipo O157: H7 é o mais estudado devido a ser comumente associado ao desenvolvimento de quadros graves na saúde humana (FREEDMAN et al., 2016). Esse sorotipo foi o primeiro a ser reportado como causador de a casos de colite hemorrágica, e desde então, é o responsável por inúmeros surtos e casos esporádicos de infecção por STEC mundialmente, sendo considera o protótipo para esse patotipo (FREEDMAN et al., 2016). Mesmo que existam centenas de sorotipos de STEC, estudos epidemiológicos demonstram que apenas alguns deles foram responsáveis por causar doenças em humanos, principalmente os sorotipos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BRYAN; YOUNGSTER; MCADAM, 2015). Além disso, o aparecimento de algumas cepas híbridas com fatores de virulência de mais de um patotipo de DEC, como o sorotipo O104:H4 (EAEC produtora de Stx, uma característica de STEC) que foi responsável por um grave surto de SHU que começou na Alemanha e se espalhou por diversos países da Europa (FRANK et al., 2011), sugere que a mobilidade dos genes associados à fatores de virulência podem influenciar no potencial patogênico dessa

cepas, fazendo com que sorotipos que não possuem relatos de infecções em humanos, possam acabar causando doenças graves.

Infelizmente, no Brasil não possuímos dados epidemiológicos oficiais em relação as infecções por STEC, sendo que os únicos dados são provenientes de trabalhos científicos nacionais, levando a possibilidade de subnotificação dos casos (GOMES; DE MELO FRANCO; DE MARTINIS, 2013). Esse quadro fica ainda mais agravado quando levamos em consideração que a maior parte dos casos de gastroenterite no país não possuem identificação do agente etiológico (BRASIL, 2015). Deste modo, não há relatos de surtos de STEC em nosso país, apenas infecções esporádicas em humanos. Entretanto, estudos demonstram a distribuição de STEC no trato gastrointestinal de diversos animais no Brasil, principalmente como portadores assintomáticos. Além do gado, que é o reservatório mais comum (FERREIRA et al., 2018; GONZALEZ et al., 2016), já foram relatados cepas de STEC em ovelhas (MARTINS et al., 2014, 2015), adubo orgânico (PUÑO-SARMIENTO et al., 2014), água (LASCOWSKI et al., 2013), pássaros (CHIACCHIO et al., 2016) e peixes (RIBEIRO et al., 2016). Vale ressaltar que alguns sorotipos relevantes associadas a infecções humanas, como O103: H2 e O157: H7, foram recuperadas das fezes de ovelhas (MARTINS et al., 2014) e bovinos (GONZALEZ et al., 2016), respectivamente. Isso deve-se possivelmente à falta de um sistema de vigilância de STEC e de um sistema de notificação centralizado (CASTRO et al., 2019).

O diagnóstico de STEC pode ser realizado de diversas formas, incluindo técnicas clássicas de cultivo, biologia molecular, sequenciamento e testes imunológicos. Um dos métodos clássicos para detecção de toxina Shiga é a observação de efeito citotóxico de sobrenadante bacteriano em células Vero. Entretanto, essa metodologia exige maior tempo e recurso. Desta forma, a utilização de imunoenaios para a detecção de toxina Shiga estão sendo usados com frequência atualmente (NEWELL; LA RAGIONE, 2018). Entretanto, esses testes imunológicos são de custo elevado, variando entre 05 e 50 dólares por amostra, tornando-se inviável em aplicações práticas na rotina em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, podendo levar à uma subnotificação dos casos (GOMES; DE MELO FRANCO; DE MARTINIS, 2013). Este valor elevado é devido à utilização de anticorpos monoclonais e/ou policlonais, os quais possuem um grande custo de produção, uma vez que envolvem, principalmente, a utilização de animais com

várias coletas de sangue e/ou eutanásia do animal (LEE et al., 2017). Assim, alguns autores propõem a utilização de imunoglobulina Y (IgY) para a detecção de toxina Shiga, devido principalmente ao seu baixo custo de produção e facilidade de obtenção/extração desses anticorpos (ARIMITSU et al., 2014; NERI et al., 2011; PARMA et al., 2012).

## 1.2. Imunoglobulinas Y (IgY)

Os anticorpos são moléculas proteicas produzidas por diversos organismos que reconhecem especificamente um antígeno, sendo produzidos como resposta ao contato com algum imunógeno (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015). Os anticorpos são amplamente utilizados em diversas aplicações de diagnóstico dos mais inúmeros antígenos, podendo ser utilizados para técnicas de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), *western blotting*, imuno-histoquímica, imunofluorescência e testes de imunodifusão (TETIN; STROUPE, 2005). Geralmente, esses testes imunológicos são produzidos utilizando anticorpos produzidos, principalmente, em mamíferos, como cabras, coelhos, ratos, cobaias, cavalos, ovelhas. A escolha da espécie que será utilizada irá depender de alguns fatores que devem ser levados em consideração, como: a especificidade do anticorpo com o antígeno (monoclonal ou policlonal), quantidade de anticorpos necessários e as condições de manejo e manutenção dos animais (LIPMAN et al., 2005). Além disso, as metodologias utilizadas envolvem imunização do animal com subsequentes coletas de sangue e/ou exsanguinação do mesmo, causando sofrimento, dor e morte do animal (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005).

Desta forma, um método alternativo, não invasivo, para a produção de anticorpos é a purificação de imunoglobulinas Y (IgY) à partir de ovos de galinha poedeira, uma vez que os anticorpos IgY são transportados do sangue do animal para a gema do ovo (MURAI, 2013). Esses anticorpos IgY possuem um título alta por um período de tempo prolongado, mesmo após decorridos vários dias após as imunizações. Além disso, a criação das galinhas é extremamente barata em comparação com outros animais utilizados para produção de anticorpos, além de serem de mais fácil manuseio e produzirem uma quantidade de anticorpos maior em

comparação com a média de anticorpos policlonais isolados de sangue de coelho (MÜLLER et al., 2015).

Em um período de um mês, é possível extrair de um coelho cerca de 200 mg de de IgG, levando em consideração a quantidade máxima de sangue que pode ser retirada nesse período. Já nesse mesmo período, é possível extrair dos ovos de uma única galinha poedeira entre 1000-2800 mg de IgY, uma quantidade bem superior se comparado à coelhos, além de não ser necessário causar dor/sofrimento nas galinhas, uma vez que os anticorpos são obtidos à partir do ovo. Este exemplo deixa evidente que a extração de anticorpos a partir de ovos de galinhas poedeiras é uma forma extremamente econômica de se obter grandes quantidades de anticorpos específicos, pois é necessário um número bem menor de animais (SCHADE et al., 2005).

Os anticorpos IgY são análogos aos IgG de mamíferos, entretanto possuem algumas diferenças estruturais. A estrutura geral da molécula de IgY é constituída de duas cadeia pesadas e duas cadeia leves, totalizando uma massa molecular de aproximadamente 180 kDa. Cada cadeia pesada possui aproximadamente 65 kDa, enquanto a cadeia leve aproximadamente 25 kDa (PEREIRA et al., 2019). Entretanto, ao contrário do IgG de mamíferos que possui 3 domínios Ig constantes em sua cadeia pesada, a cadeia pesada de IgY consiste em quatro domínios Ig constantes. Além disso, as IgY possuem a presença de resíduos de glicina e prolina entre as  $C_{H1}/C_{H2}$  e  $C_{H2}/C_{H2}$ , levando assim à uma menor flexibilidade comparada ao IgG. Assim como a IgG de mamíferos, a região Fab da IgY contém o sítio de ligação ao antígeno, enquanto a região Fc contém domínios responsáveis pela ativação do complemento, opsonização e sensibilização de mastócitos (MA; O'KENNEDY, 2015; PEREIRA et al., 2019) .

Para a extração de IgY da gema dos ovos, é necessário, primeiramente, separar a gema da clara e em seguida remover os lipídeos da gema e prosseguir com a purificação proteica. Os principais métodos de purificação de IgY são: precipitação, cromatografia e ultrafiltração (PAULY et al., 2011), sendo que a seleção do método mais adequado dependerá de vários fatores, como custo, rendimento e aplicação (AKITA; NAKAI, 1993; REN et al., 2016). Além disso, mais de um método de purificação podem ser utilizados de forma combinada, aumentando assim a pureza da purificação desses anticorpos (LEE et al., 2017).

A IgY purificada pode ser armazenada por até 5 anos sem perder sua atividade de reconhecimento à 4° C, por 5 meses a temperatura ambiente e por 1 mês à 37° C (PEREIRA et al., 2019). Além disso, IgY é estável em valores de pH de 3,5 a 11,0 e a temperaturas de até 70 °C, podendo ainda ser mais estável à temperatura maiores com a adição de açúcares como lactose, sorbitol e tralose, e a resistência ao pH mais ácido pode ser aumentada pela adição de soluções ricas em proteínas (LEIVA et al., 2020).

Uma das grandes vantagens do uso de IgY, é que esse anticorpos não reagem de forma cruzada com receptores Fc, fator reumatóide e tampouco ativam o sistema complemento. Desta forma, sua utilização em testes de diagnósticos reduz a ocorrência de resultados falso-positivos e de reações imunológicas adversas se administrado em humanos (PEREIRA et al., 2019). Desta forma, a utilização de IgY como imunoterapia e para a formulação de testes imunológicos para diagnósticos está cada vez mais sendo explorada, onde já foram publicados diversos trabalhos para detecção de vírus, bactérias, protozoários, fungos e toxinas, em amostras de humanos, outros animais e alimentos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010; PEREIRA et al., 2019). Além disso, a pesquisa de IgY como imunoterapia, de forma profilática e/ou tratamento, já está bem avançada, de forma que alguns testes já foram para ensaios clínicos de Fase II e III (LEIVA et al., 2020).

Considerando a importância do diagnóstico de STEC, este estudo teve como objetivo produzir anticorpos IgY em galinhas poedeiras contra o Stx e avaliar sua reatividade para uma possível aplicação em diagnósticos e imunoprofilaxia.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular - 8ª ed.** Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2015.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 2, p. 207–214, 1993.
- ARIMITSU, H. et al. Evaluation of Shiga toxin 2e-specific chicken egg yolk immunoglobulin: Production and neutralization activity. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 11, p. 643–648, 2014.
- BAESHEN, M. N. et al. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 953–62, 2015.
- BEDDOE, T. et al. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 7, p. 411–418, 2010.
- BÉKÁSSY, Z. D. et al. Intestinal damage in enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Pediatric Nephrology**, v. 26, n. 11, p. 2059–2071, 2011.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, 2011.
- BIRAN, D.; RON, E. Z. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 416, n. October, p. 149–161, 2018.
- BLANCO, M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 645–51, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Serviço de Vigilância em Saúde (SVS). Doenças Transmitidas por Alimentos. 2015. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>> Acesso em: 21 agosto 2020.
- BRYAN, A.; YOUNGSTER, I.; MCADAM, A. J. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 247–272, 2015.

- CALDERWOOD, S. B. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM news**, v. 62, p. 118–119, 1996.
- CASTRO, V. S. et al. Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* in Brazil: A systematic review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019.
- CHIACCHIO, R. M. G. DI et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. **Veterinary Microbiology**, v. 184, p. 27–30, 2016.
- CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.
- DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3–4, p. 173–180, 2010.
- FAO/WHO. Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods Microbiological Risk Assessment **Series 32, Report**. [s.l: s.n.], 2019.
- FARFAN, M. J.; TORRES, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 903–913, 2012.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Distribution of the stx1 and stx2 genes in *Escherichia coli* isolated from milk cattle according to season, age, and production scale in southwestern region of Goiás, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1807–1813, 2018.
- FRANK C, WERBER D, CRAMER JP, ASKAR M, FABER M, AN DER HEIDEN M, BERNARD H, F. A.; PRAGER R, SPODE A, WADL M, ZOUFALY A, JORDAN S, KEMPER MJ, FOLLIN P, MÜLLER L, KING LA, ROSNER B, BUCHHOLZ U, STARK K, K. G. H. I. T. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771–1780, 2011.
- FREEDMAN, S. B. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: A meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 10, p. 1251–1258, 2016.
- GARRITY, G.; BELL, J.; LILBURN, T. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Boston, MA: Springer US, 2005.

- GOMES, B. C.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; DE MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: Bacterial pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 3, p. 197–205, 2013.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GONZALEZ, A. G. M. et al. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 1130–1143, 2016.
- HONG, W. et al. Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 328–335, 2012.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.
- KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011.
- KING, T. et al. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6514–6528, 2010.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 18, n. 3, p. 775–9, dez. 1977.
- LASCOWSKI, K. M. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1230–1239, 2013.
- LEE, M. S.; TESH, V. L. Roles of shiga toxins in immunopathology. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 1–26, 2019.
- LEE, W. et al. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, p. 71–85, 2017.
- LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **ILAR journal**, v. 46, n. 3, p. 269–79, 2005.

- LEIVA, C. L. et al. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. **International Immunopharmacology**, v. 81, n. January, p. 106269, 2020.
- LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258–267, 2005.
- MA, H.; O'KENNEDY, R. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1348, p. 7–11, 2015.
- MARTINS, F. H. et al. First description of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 strain isolated from sheep in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 1, p. 126–128, 2014.
- MARTINS, F. H. et al. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 1, p. 150–156, 2015.
- MELE, C.; REMUZZI, G.; NORIS, M. Hemolytic uremic syndrome. **Seminars in Immunopathology**, v. 36, n. 4, p. 399–420, 2014.
- MÜLLER, S. et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2015.
- MURAI, A. Maternal transfer of immunoglobulins into egg yolks of birds. **Journal of Poultry Science**, v. 50, n. 3, p. 185–193, 2013.
- NERI, P. et al. Specific egg yolk immunoglobulin as a new preventive approach for shiga-toxin-mediated diseases. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
- NEWELL, D. G.; LA RAGIONE, R. M. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. May 2017, p. 49–71, 2018.
- NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. July, p. 90, 2012.
- O'BRIEN, A. D. et al. Production of shigella dysenteriae type j-like cytotoxin by escherichia coli. **Journal of Infectious Diseases**, v. 146, n. 6, p. 763–769, 1982.

- PARMA, Y. R. et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. June, p. 84, 2012.
- PAULY, D. et al. Igy technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, v. i, n. 51, p. 2–7, 2011.
- PEREIRA, E. P. V et al. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International immunopharmacology**, v. 73, n. January, p. 293–303, ago. 2019.
- PUÑO-SARMIENTO, J. et al. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 9, p. 8924–8939, 2014.
- REN, H. et al. A Comparative Evaluation of Six Principal IgY Antibody Extraction Methods. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 44, n. 1, p. 11–20, 1 mar. 2016.
- RIBEIRO, L. F. et al. Shiga toxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* in water and fish from pay-to-fish ponds. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 216–220, 2016.
- RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England journal of medicine**, v. 308, n. 12, p. 681–5, 24 mar. 1983.
- RODRIGUES, J. L.; RODRIGUES, L. R. Potential Applications of the *Escherichia coli* Heat Shock Response in Synthetic Biology. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 186–198, 2018.
- 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. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 129–154, 1 abr. 2005.
- SCHARFF, R. L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the united states. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 123–131, 2012.
- STEVENS, M. P.; FRANKEL, G. M. The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. 1–25, 2014.
- TARR, P. I.; GORDON, C. A.; CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9464, p. 1073–86, mar. 2005.

TETIN, S.; STROUPE, S. Antibodies in Diagnostic Applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 9–16, 2005.

TEUNIS, P. F. M.; OGDEN, I. D.; STRACHAN, N. J. C. Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 6, p. 761–770, 2008.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Produzir anticorpos IgY em galinhas poedeiras contra toxina Shiga e avaliar sua reatividade para uma possível aplicação em diagnósticos e profilaxia.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Inocular subunidade B recombinante da toxina Shiga 2 (rStx2aB) em galinhas poedeiras;
- Extrair e purificar imunoglobulinas Y (IgY) à partir dos ovos das galinhas;
- Avaliar a reatividade dos IgY contra rStx2aB por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e *Western Blotting*;
- Avaliar a capacidade de neutralização de atividade citotóxica de sobrenadante de cepa de STEC.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

#### Utilização de subunidade B recombinante de Stx2a para produção e caracterização de imunoglobulinas Y contra toxina Shiga

Leonardo Medeiros<sup>1</sup>, Gerson Nakazato<sup>1\*</sup>

**Resumo:** *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) é um patógeno de veiculação alimentar com grande significância na saúde pública humana e com grandes impactos econômicos. Vários surtos causados por STEC tem ocorrido no mundo todo, porém no Brasil essas infecções são ocasionais e não associados a surtos. As toxinas Shiga (Stx) são os principais fatores de virulência de STEC, e muitas vezes são utilizadas como antígeno para diagnóstico da presença desse patótipo. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi produzir anticorpos IgY em galinhas poedeiras contra Stx utilizando como antígeno a subunidade B recombinante da Stx do tipo 2 (rStx2aB), e avaliar sua reatividade para uma possível aplicação em diagnósticos e profilaxia. O rendimento médio de extração de proteína total nas gemas foi de 5,2 mg por mL de gema, totalizando cerca de 41,6 mg de IgY por ovo. Uma alta resposta específica contra rStx2aB nos anticorpos IgY purificados dos ovos foi observada cerca de 35 dias após a primeira imunização aumentou mais ainda após a 8ª semana e manteve-se estável até a 15ª semana. Além disso, o IgY purificado anti-Stx2B pode neutralizar efetivamente a atividade citotóxica de sobrenadante da cepa STEC O157:H7 86-24 em células Vero. Nosso trabalho demonstra que a utilização de subunidade B recombinante da Stx2a representa uma boa alternativa para gerar anticorpos IgY específicos, os quais possuem um grande potencial para serem aplicados em diagnósticos e profilaxia de STEC.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; STEC; toxina Shiga; IgY.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa postal 10011, 86.057 – 970, Londrina, PR, Brasil.

\* Autor correspondente: gersonakazato@yahoo.com.br

## 1. Introdução

*Escherichia coli* é uma espécie de bactéria Gram-negativa comumente presente como microbiota de humanos e outros animais, entretanto, algumas cepas patogênicas podem causar doenças, de quadros leves até a morte (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entre as patogênicas, as cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são um patógeno de veiculação alimentar com grande significância na saúde pública humana, acarretando cerca de 120 mortes e deixando mais de 1 milhão de pessoas doentes anualmente (FAO/WHO, 2019). Além das perdas pessoais, os danos econômicos causados por esse patótipo são de grande importância, quando somado as perdas no agronegócio e saúde pública, causando mais de 700 milhões de dólares em prejuízos anualmente, somente nos Estados Unidos, segundo uma estimativa de Scharff (2012).

O principal fator que possui influência no agravamento das infecções por STEC é a produção de toxina Shiga (Stx), uma citotoxina semelhante à produzida por *Shigella dysenteriae* sorotipo 1, que pode ser dividida em Stx tipo 1 (Stx1) e Stx tipo 2 (Stx2). Esses subtipos ainda possuem variantes, sendo os de Stx1: Stx1a, Stx1c e Stx1d; e de Stx2: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g. Isso faz com que cada subtipo/variante possua um tipo de ação diferente que pode ou não ocasionar uma doença mais grave por infecções de STEC (LEE; TESH, 2019).

O diagnóstico de STEC pode ser realizado de diversas formas, incluindo técnicas clássicas de cultivo, biologia molecular, sequenciamento de DNA e testes imunológicos. Um dos métodos clássicos para detecção de Stx é a observação de efeito citotóxico de sobrenadante bacteriano em células Vero. Entretanto, essa metodologia exige maior tempo e recurso. Portanto, a utilização de imunoenaios para a detecção de Stx estão sendo usados com frequência atualmente (NEWELL; LA RAGIONE, 2018). Entretanto, esses testes imunológicos são de custo elevado, variando entre 5 e 50 dólares por amostra, tornando-se inviável em aplicações práticas na rotina em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, podendo levar à uma subnotificação dos casos (GOMES; DE MELO FRANCO; DE MARTINIS, 2013). Este valor elevado é devido à utilização de anticorpos monoclonais e/ou policlonais, os quais possuem um grande custo de produção, uma

vez que envolvem, principalmente, a coleta de sangue e/ou eutanásia de animais (LEE et al., 2017).

Desta forma, um método alternativo, não invasivo, para a produção de anticorpos é a purificação de imunoglobulinas Y (IgY) a partir de ovos de galinha poedeira, uma vez que os anticorpos IgY são transportados do sangue do animal para a gema do ovo (MURAI, 2013). Esses anticorpos IgY possuem uma titulação alta por um período de tempo prolongado, mesmo após decorridos vários dias após as imunizações. Além disso, a criação das galinhas é extremamente barata em comparação com outros animais utilizados para produção de anticorpos, além de serem de mais fácil manuseio e produzirem uma quantidade de anticorpos maior em comparação com a média de anticorpos policlonais isolados de sangue de coelho (MÜLLER et al., 2015). Assim, alguns autores propõem a utilização de imunoglobulina Y (IgY) para a detecção de Stx (ARIMITSU et al., 2014; NERI et al., 2011; PARMA et al., 2012).

Considerando a importância do diagnóstico de STEC, este estudo teve como objetivo produzir anticorpos IgY em galinhas poedeiras contra o Stx e avaliar sua reatividade para uma possível aplicação em diagnósticos e profilaxia.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Clonagem e expressão de subunidade B recombinante de Stx2a**

Para utilizar como imunizante nas galinhas, a subunidade B de Stx2a (rStx2aB) foi produzida de forma recombinante em *E. coli* BL21. Resumidamente, utilizando como base o DNA genômico da cepa de *E. coli* O157:H7 EDL 933 (NCBI RefSeq: NC\_002655.2), o fragmento do gene que codifica a subunidade B de Stx2a foi amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e inserido no vetor pET22b (Novagen/Merck, Darmstadt, DEU, Germany) “*in frame*” com a marcação poli-histidina (6xHis) do vetor na porção C-terminal. O vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Robert Alvin Bernedo-Navarro.

Os vetores recombinantes foram transformados em *E. coli* DH5- $\alpha$ , multiplicados e verificados se houve ou não a inserção correta do fragmento de DNA no vetor por clivagem e sequenciamento de DNA. Posteriormente, para as bactérias

transformadas com o vetor recombinante, seus plasmídeos extraídos utilizando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e transformados em *E. coli* BL21 DE3 para expressão das proteínas recombinantes.

A expressão das proteínas recombinantes foi realizada através do sistema de autoindução (STUDIER, 2014) em culturas com volume final de 1 L. As proteínas recombinantes foram extraídas do periplasma por lise osmótica (QUAN et al., 2013), e o extrato obtido foi submetido a cromatografia de afinidade não-desnaturante com imidazol (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) usando Ni-NTA Agarose (Qiagen, Redwood City, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Para concentrar as proteínas recombinantes e remover o imidazol do meio, foram utilizados concentradores proteicos de centrifugação (Pierce™ Protein Concentrator 3K MWCO; Thermo Scientific™, Wilmington, DE, USA) com tampão fosfato-salina (PBS 0,01M pH 7,4).

A pureza e concentração das proteínas recombinantes, obtidas após a cromatografia, foram determinadas pelo método de SDS-PAGE e método de Bradford, respectivamente. Além disso, a confirmação da expressão correta da proteína recombinante foi confirmada por *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal anti marcação 6x-his conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP; Thermo Scientific™).

## 2.2. Inóculo nas galinhas e coleta de ovos

Os procedimentos em animais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA, nº 13643.2019.89). Para a produção de IgY, foram utilizadas 2 galinhas poedeiras da linhagem White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*), com 20 semanas de vida, fornecidas e mantidas na Fazenda Escola da UEL. Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas, à temperatura ambiente, recebendo água potável e ração de postura à vontade. Além disso, as galinhas foram acompanhadas pelo veterinário responsável para assegurar as condições de saúde e higiene dos animais durante o período do experimento. Cada ave foi imunizada 5 vezes, inoculando por via intramuscular em quatro pontos distintos, nos músculos peitorais direito e esquerdo, com 100 µg de rStx2aB, sendo

a primeira imunização (dia 0) utilizando emulsão de Adjuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich®); e as posteriores quatro doses de reforço, com um período de intervalo de 15 dias entre elas (dias 15, 30, 45, 60) utilizando Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma-Aldrich®).

Os ovos foram coletados no dia anterior à primeira inoculação, e diariamente a partir do 7º dia até 45 dias após a última inoculação. Os ovos coletados após o 7º dia foram processados em “pools”, referentes às semanas.

### 2.3. Purificação de Anticorpos IgY

A extração do IgY dos ovos foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, descrito por Akita & Nakai (1993) com algumas modificações. A gema dos ovos sem a película protetora foi diluída em seis partes de água destilada ácida (pH 2,5), o pH da solução foi ajustado (pH 5,0) e posteriormente incubada por 18 horas à 4 °C. Após incubação, a parte superior proteica foi filtrada em papel filtro (Whatmann nº 1), adicionado aos poucos sulfato de amônio (Synth®, Diadema, SP, BR) até a concentração 33% (m/v), incubado sob agitação por 4 horas à 4 °C, e posteriormente centrifugado por 15 minutos a 5000 x *g*.

O precipitado foi ressuspendido em solução de sulfato de sódio (8 mL por gema; 18%; Synth®) e incubado sob agitação à 4 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 5000 x *g* por 30 minutos à 4 °C. Novamente, o novo precipitado foi ressuspendido em sulfato de sódio (8 mL por gema; 14%; Synth®) e incubado sob agitação à 4 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 5000 x *g* por 30 minutos à 4 °C. O precipitado, foi ressuspendido em solução salina fosfato tamponada (PBS; 2mL por gema; pH 7,4) e filtrado em membrana filtrante (0,22 µm) para esterilização. A pureza e concentração de IgY obtida após a purificação foi determinada pelo método de SDS-PAGE e método de Bradford, respectivamente.

### 2.4. Testes de reatividade dos anticorpos IgY produzidos contra rStx2aB

#### 2.4.1. *Western Blotting*

Para verificar a especificidade dos anticorpos produzidos contra rStx2aB, o teste de “*Western Blotting*” foi realizado, 5 µg de proteína recombinante rStx2aB foi submetida ao método de SDS-PAGE e posteriormente transferida para uma membrana de nitrocelulose (0,45µm; Bio-Rad, CA, USA) à 30V, 150 mA, 4 °C por 16 horas. A membrana foi corada com solução Ponceau S (Sigma-Aldrich®) (SANDER et al., 2019) para confirmar a transferência. Após a confirmação, a membrana foi lavada com água destilada para remover o Ponceau S e incubada em PBST-leite (0,1% Tween 20; 5% leite) a 37 °C por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST (0,1% Tween 20; pH 7,4) e incubada em IgY anti-rSt2B (20µg/mL) diluído em PBST-Leite (0,1% Tween 20; 1% leite) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação (30 rpm). Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBST (0,1% Tween 20; pH 7,4) e incubada em IgG anti-IgY-HRP (A9046, Sigma; 1:2000) diluído em PBST-Leite (0,1% Tween 20; 1% leite) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação leve (30 rpm). A membrana foi lavada 3 vezes com PBST (0,1% Tween 20; pH 7,4) e a revelação foi realizada com solução TMB pronta para uso (TMB Solution (BLOT), 002019, Invitrogen). Para estimativa da massa molecular dos antígenos, foi adicionado em um dos poços peso molecular pré-corado (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, 10748010, Invitrogen®).

#### 2.4.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A reatividade dos anticorpos IgY anti-rStx2aB foram determinados por Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para isso, microplacas de 96 poços de alta afinidade (MICROLON™ 600 High Binding, Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT) foram sensibilizadas com 0,1 µg/poço de rStx2aB em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05M (pH 9,6) e incubadas à 4 °C por 18h. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBST (0,05% Tween 20; pH 7,4) e bloqueadas com PBST-leite (0,05% Tween 20; 5% leite) por 1 h à 37 °C. Depois disso, três lavagens foram realizadas com PBST (0,05% Tween 20; pH 7,4) e os anticorpos IgY anti-rStx2aB (semana por semana) foram colocados em concentrações diluídas em série (de 1 mg/mL a 0,95 ng/mL) para determinação da reatividade do anticorpo. Os anticorpos IgY forma diluídos em PBST-leite (0,05% Tween 20; 1% leite) e incubados por 1 h à 37 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBST (0,05% Tween 20; pH 7,4) e incubadas em IgG anti-IgY-HRP (A9046, Sigma; 1:30000) diluído em PBST-Leite (0,05% Tween 20; 1% leite) e incubado por 1 h à 37

° C. As placas foram lavadas novamente com PBST (0,05% Tween 20; pH 7,4) e incubadas em substrato de revelação cromogênio (contendo 0,1 mg de tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich®) , 0,006% de hidrogênio peróxido (Synth®) em tampão e acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 ) à 37 ° C durante 15 minutos. Finalmente, foi adicionado 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2 N para interromper a reação, e a leitura da densidade óptica foi realizada em 450 nm em leitor de placas (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, Biotek). Como controle negativo foram utilizados anticorpos IgY extraídos de ovos antes do primeiro inóculo nas galinhas (pré-inóculo). A reatividade foi considerada positiva quando o sinal obtido pela leitura for maior que [(2 x média) + (3 x desvio padrão)] da leitura obtida pelos controles negativos (pré-inóculo).

## 2.5. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica de sobrenadante de STEC

A neutralização de toxicidade de STEC foi avaliada por ensaio baseado em células Vero (ATCC CCL-81) utilizando sobrenadante de *E. coli* O157:H7 produtora de Stx2a (86-24) e cepa não produtora de Stx (*E. coli* Dh5-alfa) em contato com os anticorpos IgY anti-rStx2aB (15ª semana). Foi utilizado como controle de célula o cultivo celular sem sobrenadante bacteriano (100% viabilidade celular).

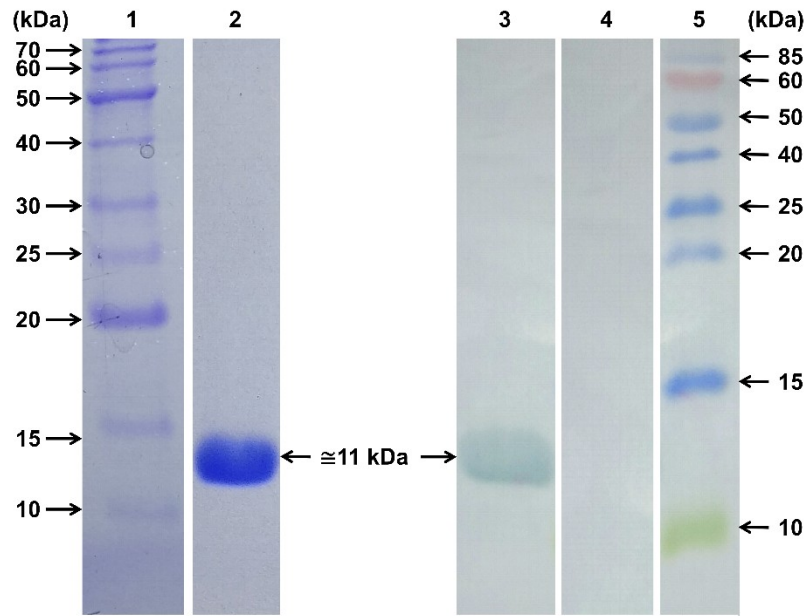
A extração de sobrenadante de cepa produtora e não produtora de Stx foi realizada segundo a metodologia de Rocha & Piazza (2007). Uma colônia foi semeada em caldo Luria Bertani (LB; Difco®, Sparks, MD, USA) a 37 °C, por 18 horas, em agitação (180 rpm). Após a incubação, uma diluição de 1:100 do crescimento do LB foi semeado em um caldo EC (Merck), suplementado com 5 ng/mL de ciprofloxacina para aumentar a expressão proteica (Sigma-Aldrich®), e incubado a 37 °C por 4 horas em agitação constante (250 rpm). A cultura de caldo EC foi centrifugada a 13000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana PES 0,22 µm (Merck). Os sobrenadantes filtrados foram diluídos 1:10 em Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) contendo anticorpos IgY anti-rStx2aB (15ª semana) em concentrações diluídas em série de duas vezes (10 µg/mL a 0,156 µg/mL) e incubados a 37 °C por 1 hora.

Células Vero foram crescidas em microplacas de 96 poços para cultivo de células (TPP®, Trasadingen, CH) com uma densidade de 25.000 células por poço até formar uma monocamada confluenta à 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®) e 1% de solução de antibióticos (penicilina (1000 U/mL) e estreptomicina (250 µg/mL); Sigma-Aldrich®). Após atingir a confluência necessária, as placas foram lavadas com PBS (pH 7,0) e foram adicionados aos poços DMEM contendo a mistura de anticorpos e sobrenadantes, com subsequente incubação por 48 horas à 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS (pH 7,0), as células foram fixadas com PBS contendo 2% de formaldeído (Synth®) por 10 minutos e coradas com PBS contendo 0,13% de violeta de cristal (Synth®) por 10 minutos, conforme descrito por Gentry & Dalrymple (1980) com pequenas modificações. Após a coloração, as placas foram lavadas 6x com PBS e o cristal violeta adsorvido nas células foi solubilizado em PBS contendo 50% etanol (Synth®) por 30 minutos. Após esse período, o cristal violeta solubilizado foi transferido para outra placa e realizada a quantificação por absorbância a 595 nm. A porcentagem de neutralização foi calculada usando a seguinte fórmula:  $((DO \text{ sobrenadante} + \text{anticorpo}) - (DO \text{ sobrenadante})) / ((DO \text{ controle célula}) - (DO \text{ sobrenadante})) * 100$ . Todos os dados representam a média de ensaios em triplicata.

### 3. Resultados

#### 3.1. Clonagem e expressão de rStx2aB

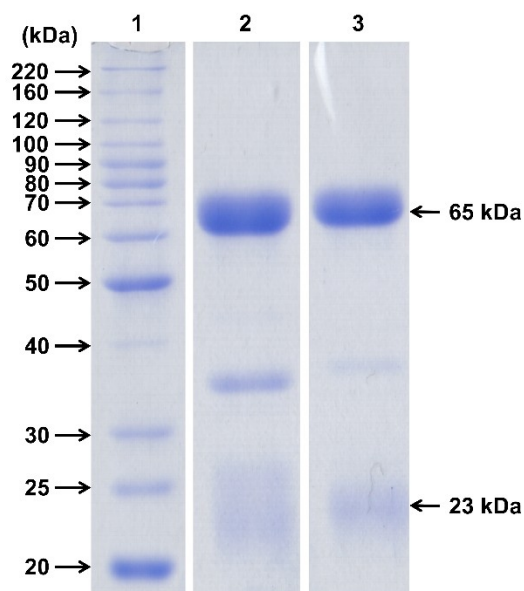
O rendimento médio de produção de rStx2aB recombinante, após a purificação utilizando resina Ni-NTA, foi de 4,4 mg para cada litro de cultivo. A análise de SDS-PAGE do rStx2aB purificado é mostrada na Fig. 1. Uma banda entre 10 e 15 kDa foi observada nas frações eluídas, sendo esta banda provavelmente corresponde à conformação monomérica de rStx2aB (MW teórico: 11 kDa), sendo realizado a análise de “*Western Blotting*” utilizando IgG anti-6xhis-tag-HRP para confirmar a expressão correta da proteína recombinante. A análise densitométrica das bandas de proteína, utilizando o programa ImageJ, no SDS-PAGE revelou pureza > 94% nas preparações de proteína purificada.



**Figura 1: Proteína recombinante rStx2aB – Análise de SDS-PAGE (1 – 2) e Western Blotting (3 – 5).** (1) BenchMark™ Protein Ladder, 10747012, Invitrogen®. (2) rStx2aB purificada – 5 µg. (3) rStx2aB purificada incubada com IgY da 15ª semana - 20 µg/mL. (4) rStx2aB purificada incubada com IgY pré-inóculo – 20 µg/mL. (5) BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen®.

### 3.2. Purificação de Anticorpos IgY

Após os processos de extração e purificação de IgY, o rendimento médio de extração de proteína total nas gemas foi cerca de 41,6 mg de IgY por ovo. O perfil eletroforético por SDS-PAGE dos anticorpos IgY extraídos da gema de ovo de galinhas, inoculadas e não inoculadas com rStx2aB, está presente na Fig. 2., na qual, pode ser observado a presença de proteínas com tamanho de 65 kDa e 23 kDa, correspondentes às cadeias pesadas e leves de IgY. Também foram observadas proteínas contaminantes de aproximadamente 35 kDa, que não conseguiram ser removidas durante a purificação.



**Figura 2: Análise dos IgY purificados por SDS-PAGE. (1)** BenchMark™ Protein Ladder, 10747012, Invitrogen®. **(2)** IgY Pré-inóculo – 5µg. **(3)** IgY 15ª semana (5µg).

### 3.3. Testes de reatividade dos anticorpos IgY produzidos contra rStx2aB

#### 3.3.1. *Western Blotting*

A análise de reatividade dos anticorpos IgY (15ª semana) contra rStx2aB por “*Western blotting*” revelou uma banda aproximadamente 12 kDa, compatível com o tamanho da proteína recombinante rStx2aB (Fig. 1), enquanto os anticorpos IgY pré-imune, obtidos das galinhas antes das imunizações, não apresentaram imunorreatividade contra rStx2aB (Fig. 1).

#### 3.3.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os níveis de reatividade dos IgY, mostraram que galinhas inoculadas começam a apresentar um aumento nos níveis de IgY anti-rStx2aB nos ovos a partir da terceira imunização (5ª semana), atingindo níveis mais elevados a partir da 4ª imunização (7ª semana) e mantendo-se altos até a 15ª semana, enquanto IgY pré-ímmunes, obtidos das galinhas antes da primeira imunização, não apresentaram reatividade contra rStx2aB (Fig. 3). Na 15ª semana, os ovos obtidos das galinhas inoculadas com rStx2aB apresentaram níveis mais elevados de anticorpos anti-

rStx2aB do que os animais não inoculados, com a menor concentração de anticorpos reativos de 0,97 µg/mL.

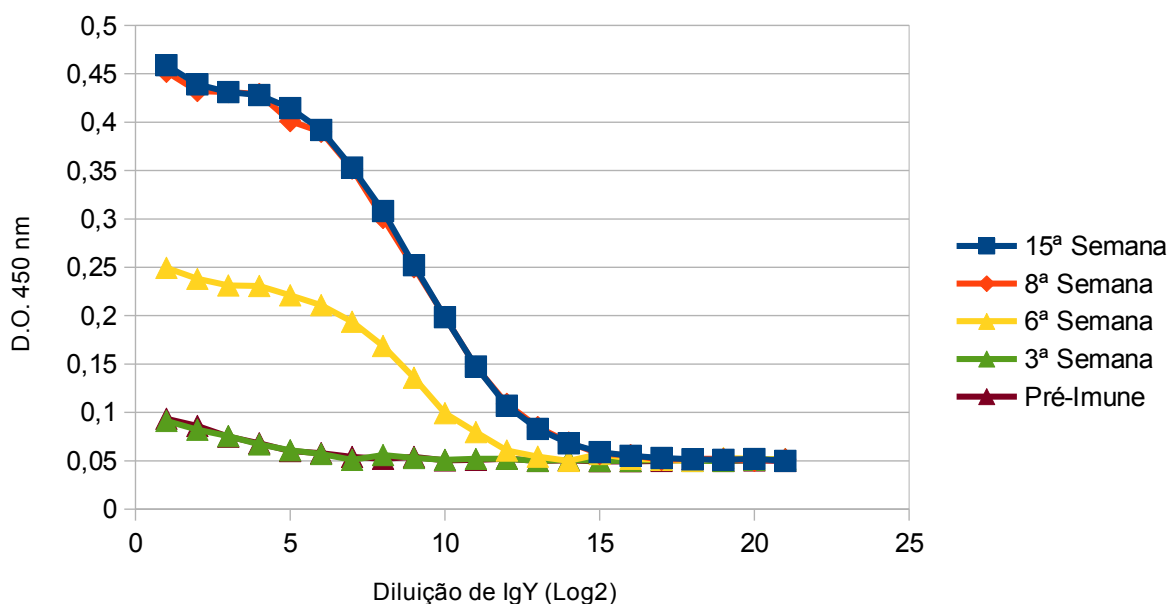
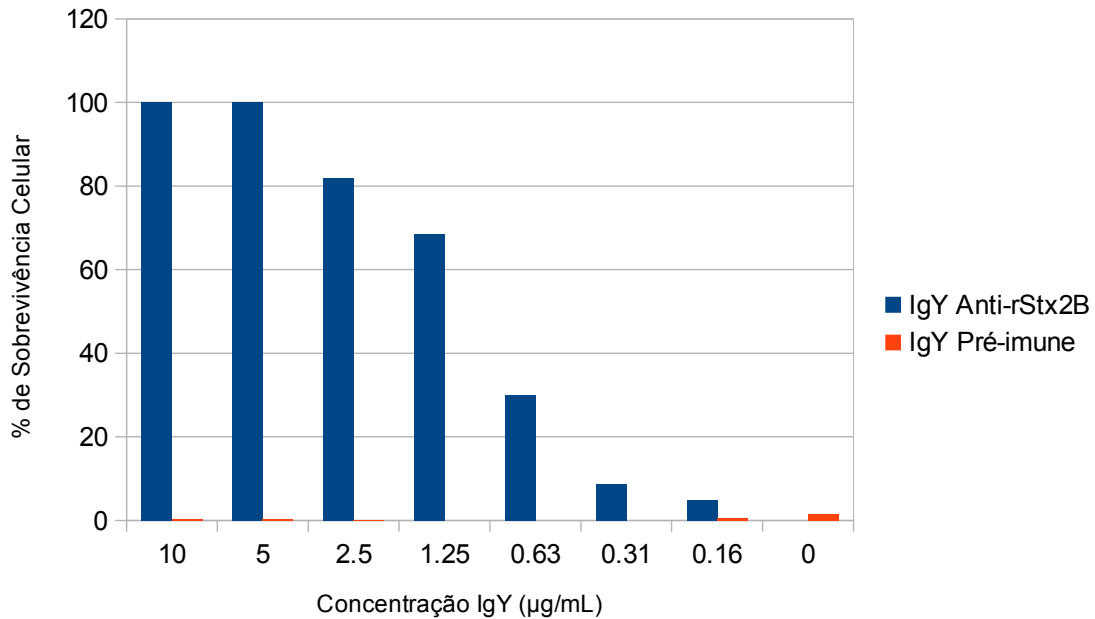


Figura 3: Reatividade de anticorpos IgY contra rStx2aB. Microplacas de ELISA revestidas com rStx2aBe incubadas com diluições em série de 2 vezes de IgY purificada. IgY pré-imune corresponde a anticorpos purificados de ovos coletados antes da 1ª imunização.

### 3.4. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica de sobrenadante de STEC

O ensaio de neutralização de atividade citotóxica baseado em células Vero foi utilizado para testar se os anticorpos IgY anti-rStx2aB eram capazes de prevenir a atividade citotóxica do sobrenadante da cepa 86-24 de *E. coli* O157:H7. Os anticorpos IgY anti-rStx2aB neutralizaram os efeitos citotóxicos nas células Vero (Fig. 4). Os dados obtidos mostram que os anticorpos IgY anti-rStx2aB foram eficientes em diminuir a citotoxicidade em mais de 50% com uma concentração de 1,25 µg/mL e em 100% com uma concentração de 5 µg/mL. As células Vero que foram tratadas apenas com a mistura de anticorpos pré-imune morreram utilizando as mesmas concentrações. Além disso, o sobrenadante da cepa DH5α não apresentou atividade citotóxica, tanto em presença ou ausência de anticorpos IgY (dados não mostrados).



**Figura 4:** Neutralização de Stx2 in vitro com IgY. Diluições em série de duas vezes de IgY foram incubadas com diluição 1:10 do sobrenadante de STEC 86-24. A viabilidade das células Vero foi determinada por coloração com violeta de cristal e a absorbância foi lida a 595 nm.

#### 4. Discussão

Em nosso trabalho, foram gerados anticorpos IgY específicos com capacidade de ligação contra rStx2aB após imunização desse antígeno recombinante em galinhas poedeiras. Além disso, foi detectado atividade de neutralização de citotoxicidade na cepa de *E. coli* O157:H7 86-24, demonstrando que os anticorpos gerados possivelmente possuem reatividade contra a Stx2a nativa, uma das principais Stx associadas aos surtos de STEC mundialmente.

A concentração de anticorpos obtidas por gema em nosso trabalho foi superior a encontrada em outros estudos que produziram e purificaram anticorpos igY contra Stx recombinante ou nativa (FATHI et al., 2020; PARMA et al., 2011). Calculando os custos de produção dos ovos e extração dos anticorpos, obtivemos um valor de aproximadamente R\$ 1,74 (USD 0,31) por ovo. Nesse cálculo, não consideramos custos de produção e inóculo de antígeno, testes de quantificação e reatividade dos anticorpos gerados, materiais reutilizáveis, energia elétrica,

equipamentos, água destilada e deionizada. Conseguimos uma média de aproximadamente 40 mg de anticorpos IgY por gema de ovo, sendo que destes, cerca de 10% são possivelmente específicos contra Stx (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Deste modo, cerca de 4mg de anticorpo específico contra Stx pode ser obtido de apenas um ovo, com um valor de produção e extração de aproximadamente USD 0,31, sendo um valor muito menor do que comparado com a mesma quantidade de anticorpos específicos provenientes de outros animais ou por cultivo de células.

Parma et al. (2011) produziram anticorpos anti-Stx em coelhos e em galinhas, e calculou que para obter 4 mg de anticorpos IgY específicos contra Stx2B, são necessários cerca de 5 ovos, e que para conseguir a mesma quantidade de anticorpos em coelhos, é necessário a exsanguinação de um coelho, levando a morte do mesmo.

Em relação à reatividade dos anticorpos produzidos em nosso trabalho, foram encontrados níveis significativos de anticorpos específicos a partir da 4ª imunização (7ª semana após 1º inóculo), e essa alta titulação manteve-se até 45 dias após a 5ª imunização (15ª semana após 1º inóculo), sugerindo que a rStx2aB possuiu imunogenicidade duradoura em galinhas da linhagem White Leghorn.

Esse padrão de resposta duradouro é semelhante ao encontrado por Neri et al. (2012), que também utilizou uma subunidade B recombinante de toxina Shiga, tanto tipo 1 como tipo 2, como imunizantes, atingindo títulos altos mesmo após 8 semanas da última imunização de reforço. Entretanto, Feng et al. (2013) obtiveram uma titulação alta após a 4ª semana e após a 8ª semana, essa titulação começou a cair e na 11ª semana já possuía níveis baixos de anticorpos reativos. Isso pode ser explicado pelo fato de que o subtipo de toxina utilizado como base para a construção do recombinante foi o subtipo Stx2e, já no nosso trabalho e de Neri et al. (2012), o subtipo utilizado como base foi o Stx2a.

Embora os anticorpos IgY sejam amplamente utilizados em imunoenaios, como ELISA, *western blotting*, imuno-histoquímica e imunofluorescência, para diversos microrganismos e doenças (PEREIRA et al., 2019), apenas Parma et al. (2012) desenvolveram um teste imunológico de diagnóstico de Stx, sendo este baseado em ELISA de captura juntamente com anticorpos policlonais provenientes

de coelhos. Isso demonstra que a aplicação de anticorpos IgY na detecção de Stx deve ser mais explorada, uma vez que a utilização de diagnósticos baseados em IgY possuem um menor valor quando comparado aos baseados em anticorpos monoclonais ou policlonais produzidos em coelhos e outros animais.

Uma possibilidade de imunoenensaio rápido que ainda não foi explorada para diagnóstico de Stx utilizando IgY, são os testes imunocromatográficos de fluxo lateral (LFA). Esse tipo de teste utilizando IgY já foi desenvolvido para detecção de enterotoxina estafilocócica, com uma alta sensibilidade (JIN et al., 2013). Assim, pretendemos desenvolver similar sistema para detecção de STEC usando nossos anticorpos produzidos no presente estudo.

Além da reatividade contra rStx2aB, os anticorpos IgY conseguiram neutralizar totalmente a atividade citotóxica do sobrenadante da cepa O157:H7 86-24, produtora de Stx2a, com uma concentração de 5 µg/mL. Resultados semelhantes foram obtidos por Parma et al. (2011), que utilizando uma concentração de 4,38 µg/mL de IgY anti-Stx obteve uma neutralização total da atividade citotóxica do sobrenadante da cepa STEC O26:H11. Isso demonstra a abrangência desses anticorpos na neutralização das Stxs.

Outros trabalhos também avaliaram a atividade de neutralização de anticorpos IgY contra Stx, observando atividade de neutralização contra Stx do tipo 1 e tipo 2 (FENG; LIU; SHI, 2013; NERI et al., 2012; WANG et al., 2010). Com esses dados, podemos concluir que IgY produzido utilizando a subunidade B da Stx, é suficiente para neutralizar a toxina nativa expressa por cepas de STEC, podendo atuar como um bom neutralizante, não sendo necessário a imunização de aves com a toxina nativa, que pode causar danos à saúde dos animais. Além disso, como a Stx possui um papel importante na patogenicidade das cepas de STEC, a administração de neutralizantes pode reduzir ou prevenir a infecção e mortalidade.

Diversos estudos avaliam a capacidade de neutralização de Stx utilizando anticorpos policlonais e monoclonais, nanoanticorpos e análogos de Gb3, inclusive alguns desses neutralizantes já estão em testes clínicos de fase II (BERNEDO-NAVARRO et al., 2018; HALL; KUROSAWA; STEARNS-KUROSAWA, 2017). Entretanto, somente alguns estudos avaliaram a capacidade de neutralização de Stx *in vitro* e *in vivo* utilizando IgY, demonstrando inclusive que a capacidade de

neutralização de anticorpos IgY é semelhante à anticorpos produzidos em coelhos (ARIMITSU et al., 2014; FATHI et al., 2020; FENG; LIU; SHI, 2013; NERI et al., 2011; PARMA et al., 2011; WANG et al., 2010).

Esses resultados demonstraram o potencial do uso desses anticorpos para a aplicação em kits de diagnósticos, assim como para a imunoprofilaxia para infecções causadas por STEC. Assim, pretendemos desenvolver um kit de diagnóstico imunológico de STEC para validar para detecção de Stx.

## 5. Conclusão

Nosso trabalho demonstra que a utilização de subunidade B recombinante da Stx2a é uma boa alternativa para gerar anticorpos IgY específicos, os quais possuem um grande potencial para serem aplicados em diagnósticos e imunoprofilaxia de STEC, principalmente devido ao seu baixo custo de produção e extração.

Devido a eficácia da técnica no trabalho realizado, acreditamos que anticorpos IgY apresentam um grande potencial para o diagnóstico e profilaxia de outros patógenos de importância clínica.

## 6. Referências

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 2, p. 207–214, 1993.

ARIMITSU, H. et al. Evaluation of Shiga toxin 2e-specific chicken egg yolk immunoglobulin: Production and neutralization activity. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 11, p. 643–648, 2014.

BERNEDO-NAVARRO, R. A. et al. Structural basis for the specific neutralization of stx2a with a camelid single domain antibody fragment. **Toxins**, v. 10, n. 3, p. 1–20, 2018.

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

FAO/WHO. **Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods Microbiological Risk Assessment Series 32, Report.** [s.l: s.n.].

FATHI, J. et al. Production of egg yolk antibody (IgY) against shiga-like toxin (stx) and evaluation of its prophylaxis potency in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, n. December 2019, p. 104199, 2020.

FENG, Y.; LIU, W.; SHI, D. Effectiveness of egg yolk antibody against Shiga toxin ii variant toxicity in vitro and in vivo. **Current Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 448–453, 2013.

GENTRY, M. K.; DALRYMPLE, J. M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 361–366, 1980.

GOMES, B. C.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; DE MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: Bacterial pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 3, p. 197–205, 2013.

HALL, G.; KUROSAWA, S.; STEARNS-KUROSAWA, D. J. Shiga toxin therapeutics: Beyond neutralization. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

JIN, W. et al. Application of IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, n. 3, p. 323–331, 2013.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

LEE, M. S.; TESH, V. L. Roles of shiga toxins in immunopathology. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 1–26, 2019.

LEE, W. et al. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, p. 71–85, 2017.

MÜLLER, S. et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2015.

MURAI, A. Maternal transfer of immunoglobulins into egg yolks of birds. **Journal of Poultry Science**, v. 50, n. 3, p. 185–193, 2013.

NERI, P. et al. Specific egg yolk immunoglobulin as a new preventive approach for shiga-toxin-mediated diseases. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

NERI, P. et al. Recombinant Shiga toxin B subunit can induce neutralizing immunoglobulin y antibody. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 917–923, 2012.

NEWELL, D. G.; LA RAGIONE, R. M. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. May 2017, p. 49–71, 2018.

PARMA, Y. R. et al. Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 58, n. 4, p. 380–388, 2011.

PARMA, Y. R. et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. June, p. 84, 2012.

PEREIRA, E. P. V et al. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International immunopharmacology**, v. 73, n. January, p. 293–303, ago. 2019.

QUAN, S. et al. Isolation of bacteria envelope proteins. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 966, n. 1, p. 359–66, 2013.

ROCHA, L. B.; PIAZZA, R. M. F. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: From divergence to definition. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 411–417, 2007.

SANDER, H. et al. Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. **Analytical Biochemistry**, v. 575, n. March, p. 44–53, 2019.

SCHARFF, R. L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the united states. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 123–131, 2012.

STUDIER, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1091, p. 17–32, 2014.

WANG, Q. et al. Passive protection of purified yolk immunoglobulin administered against Shiga toxin 1 in mouse models. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1003–1010, 2010.

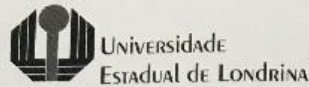
#### **4. CONCLUSÃO**

Nosso trabalho demonstra que a utilização de subunidade B recombinante da Stx2a é uma boa alternativa para gerar anticorpos IgY específicos, os quais possuem um grande potencial para serem aplicados em diagnósticos e imunoprofilaxia de STEC, principalmente devido ao seu baixo custo de produção e extração.

Devido a eficácia da técnica no trabalho realizado, acreditamos que anticorpos IgY apresentam um grande potencial para o diagnóstico e profilaxia de outros patógenos de importância clínica. Desta forma, mais estudos devem ser conduzidos utilizando os anticorpos produzidos neste trabalho, principalmente no desenvolvimento de um diagnóstico baseado em IgY.

**ANEXOS**

## Anexo 1 – OF. CIRC. CEUA nº 153/2019 (Formulário Comitê de Ética no Uso de Animais)



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 153/2019

Londrina, 23 de outubro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Produção e caracterização biológica de imunoglobulina Y (IgY) contra toxina Shiga de *Escherichia coli***" protocolo CEUA nº 13643.2019.89 sob a responsabilidade de **Gerson Nakazato**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) em **22/10/2019**.

Este projeto tem por objetivo produzir imunoglobulinas Y específicas contra a toxina Shiga e desenvolver diagnósticos imunológicos de baixo custo para esta toxina. Grau de invasividade: 1.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	15/11/2019 a 15/03/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Avc/ White Leghorn
Nº de animais	2
Peso/ Idade	1,6 a 2,5 Kg/ > 20 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Ovos não embrionados

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

*Maria Fernanda R. Graciano*  
 Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/Uel

**Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Estadual de Londrina  
 ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Hmo.(a) Sr.(a)  
 Prof. (a) Dr (a). **Gerson Nakazato**  
**Responsável pelo projeto**  
 Departamento de Microbiologia/CCB  
 C/C para a Chefia do Departamento de Microbiologia/CCB  
 C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB  
 C/C para a Fazenda Escola/CCA