



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA GUTSCHOW GAMEIRO

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY E SUA INTERAÇÃO
COM BETA-LACTÂMICOS CONTRA ACINETOBACTER
BAUMANNII E PSEUDOMONAS AERUGINOSA
MULTIRRESISTENTES**

Londrina
2020

JULIANA GUTSCHOW GAMEIRO

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY E SUA INTERAÇÃO
COM BETA-LACTÂMICOS CONTRA ACINETOBACTER
BAUMANNII E PSEUDOMONAS AERUGINOSA
MULTIRRESISTENTES**

Trabalho de Dissertação apresentado à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Fisiopatologia Clínica e
Laboratorial.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio.
Coorientador: Profa. Dra. Floristher Elaine
Carrara Marroni.

Londrina
2020

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

- G192 Gameiro, Juliana Gutschow.
Produção de anticorpos IgY e sua interação com beta-lactâmicos contra *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes / Juliana Gutschow Gameiro. - Londrina, 2020.
69 f. : il.
- Orientador: Emerson José Venancio.
Coorientador: Floristher Elaine Carrara Marroni.
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020.
Inclui bibliografia.
1. resistência - Tese. 2. beta-lactâmicos - Tese. 3. sinergismo - Tese. 4. imunoterapia - Tese. I. José Venancio, Emerson. II. Marroni, Floristher Elaine Carrara . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

JULIANA GUTSCHOW GAMEIRO

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY E SUA INTERAÇÃO
COM BETA-LACTÂMICOS CONTRA ACINETOBACTER
BAUMANNII E PSEUDOMONAS AERUGINOSA
MULTIRRESISTENTES**

Trabalho de Dissertação apresentado à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e
Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Orientador Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. EProf. Dr. Eduardo Vignoto Fernandes
Universidade Federal de Jataí - UFJ

Londrina, 18 de dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer a **Deus**, que me acompanhou, cuidou e orientou todos os dias, sem Ele sou nada. Tudo para Sua honra e glória!

A minha família, especialmente aos meus pais **Irene Gutschow** e **Antônio Gil Fernandes Gameiro** e a minha irmã **Danielle Gutschow Gameiro**, que ficaram ao meu lado dando amor, suporte e compreensão por todos esses anos de estudo. Vocês são os meus pilares e me dão forças todos os dias para continuar!

Ao **Prof. Dr. Emerson José Venancio**, meu orientador, pela oportunidade que me deu ao escolher me orientar e pelos ensinamentos dados, durante essa jornada.

A **Profa. Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni**, pelo apoio, espaço, recursos de seu laboratório e orientação neste percurso.

Aos alunos do laboratório de microbiologia (**Suelen Balero de Paula, Larissa dos Santos Fávaro e Camila Félix de Moura**), muito obrigada por terem me ajudado infinitas vezes e também me guiado durante todo o processo. Foi muito bom ter conhecido e trabalhado com vocês.

Aos alunos **Miriam Dibo e Leonardo Pinto Medeiros** do laboratório NIP3, que apareceram como verdadeiros presentes em minha vida. Sem vocês eu jamais teria terminado esse trabalho! Foi muito bom dividir a “tutela” dos animais com pessoas que tem o mesmo amor pela vida. Aprendi muito com vocês dois!

Aos **alunos e professores do laboratório do NIP9**, que me receberam e acolheram como parte da família. Agradeço pela ajuda nos problemas do dia-a-dia, pela paciência na divisão do espaço, pelas risadas e bons momentos que passamos juntos. Em especial aos meus amigos: **Patrícia Canteri de Souza, Aline Ratuchne e Alana Elke do Nascimento Corrêa**. Vocês me dão muita alegria!

Aos professores que contribuíram cedendo o espaço e equipamentos dos laboratórios, meu profundo agradecimento!

Aos meus amigos queridos, que me ajudaram dando apoio e incentivo, em especial: **Thalita Bento Talizin, Ana Flávia Mortati, Rute Gaia Fernandes, Mayara Bocchi, Thaís Sant’Ana e Mariane Cristina Mendes**.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos.”

Provérbios 16:9 – Bíblia sagrada

GAMEIRO, Juliana Gutschow. **Produção de anticorpos IgY e sua interação com beta-lactâmicos contra *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes**. 2020. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A preocupação com a resistência bacteriana a antimicrobianos tem levado a investigação de novas estratégias para o tratamento de infecções bacterianas, especialmente as causadas por *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Imunoglobulina Y (IgY) é uma classe de anticorpos presente na gema de ovos de aves que tem sua ação antimicrobiana investigada contra diversas espécies de bactérias. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi obter anticorpos IgY específicos e avaliar *in vitro* a sua atividade contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii* multirresistentes em combinação com beta-lactâmicos. Para isso, galinhas poedeiras receberam sete inoculações com amostras inativadas das cepas selecionadas com intervalos de 15 a 45 dias entre as inoculações. A partir da terceira semana os ovos foram coletados e a IgY extraída. Inicialmente foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos ceftazidima, meropenem e imipenem para microrganismos testados e a atividade antibacteriana dos anticorpos IgY produzidos contra *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. A seguir foi avaliada a interação dos antibióticos e os anticorpos IgY produzidos. Como resultados, após a terceira imunização foi obtido IgY específica, com variações no tempo para a estabilização da produção de IgY entre as diferentes cepas. Houve uma redução de quatro vezes na CIM da cepa OXA-253 para o meropenem e duas vezes para as CIMs do meropenem e ceftazidima da cepa OXA-23 quando associado à IgY. Este estudo demonstrou que há diferenças na produção de IgY em resposta as diferentes cepas. Além disso, houve redução nos valores de CIM no teste de sinergismo, para meropenem nas cepas OXA-23 e OXA-253 e ceftazidima na cepa OXA-253, nas demais cepas essa ação não foi observada. Como opções terapêuticas em microrganismos multirresistentes é limitada, estes resultados abrem caminhos para a aplicação da IgY como um complemento de terapias antimicrobianas entre bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: beta-lactamase; oxacilinas; concentração inibitória mínima; carbapenem; sinergismo; imunoterapia.

GAMEIRO, Juliana Gutschow. **Production of IgY antibodies and their interaction with beta-lactams against multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The concern with bacterial resistance to antimicrobials has led to the investigation of new strategies for the treatment of bacterial infections, especially those caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Immunoglobulin Y (IgY) is a class of antibodies present in the yolk of birds that has their antimicrobial action investigated against several species of bacteria. Thus, the objective of the present study was to obtain specific IgY antibodies and to evaluate their activity in vitro against *P. aeruginosa* and *A. baumannii* multidrug-resistant in combination with beta-lactams. For that, laying hens received seven inoculations with inactivated samples of the selected strains with intervals of 15 to 45 days between inoculations. From the third week on, eggs were collected and IgY extracted. Initially, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics ceftazidime, meropenem, and imipenem for tested microorganisms and the antibacterial activity of the IgY antibodies produced against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* was determined. Next, the interaction of antibiotics and the IgY antibodies produced were evaluated. As a result, after the third immunization, specific IgY was obtained, with variations in time for the stabilization of IgY production between the different strains. There was a four-fold reduction in the MIC of the OXA-253 strain for meropenem and twice for a MIC of meropenem and ceftazidime of the OXA-23 strain when associated with IgY. This study demonstrated that there are differences in IgY production in response to different strains. Also, there was a reduction in MIC values in the synergism test, for meropenem in the OXA-23 and OXA-253 strains and ceftazidime in the OXA-253 strain, in the other strains this action was not observed. As therapeutic options in multi-resistant microorganisms are limited, these results open the way for the application of IgY as a complement to antimicrobial therapies among multi-resistant bacteria.

Keywords: beta-lactamase; oxacillinases; minimum inhibitory concentration; carbapenem; synergism; immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura genérica das diferentes classes de beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactam..... 19
- Figura 2** – Estrutura básica de imunoglobulinas..... 23

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1** – PCR confirmation of the *Pseudomonas aeruginosa* strains genes *bla*_{KPC-2} and *bla*_{SPM-1} and for the genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-253} (also called *bla*_{OXA-143-like}), and *bla*_{OXA-51} for the *Acinetobacter baumannii* strains 44
- Figura 2** – SDS-PAGE of the different IgY extracted from the 7th Immunization..... 45
- Figura 3** – Indirect ELISA of the specific IgY for the antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* 46
- Figura 4** – Test of the specific IgY for the strains of *Acinetobacter baumannii* with the genes *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA253}..... 48
- Figura 5** – Synergism test of the specific IgY with the antibacterial drug (meropenem and ceftazidime) and the bacteria strains of *Acinetobacter baumannii* with the genes *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-253}..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas utilizadas e suas funções neste trabalho 28

Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados para as reações de PCR..... 30

ARTIGO CIENTIFICO

Table 1 – Minimal inhibitory concentration (MIC) for the antibiotics
ceftazidime, meropenem, and imipenem..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	Bactéria Gram-negativa
bp	Pares de base
CEUA	Comitê de ética de uso animal
CFU	<i>Colony Formation Unit</i>
CHROMagar	<i>Chromogenic culture media</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CTL +	<i>Positive Control</i>
CTL -	<i>Negative Control</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
ELISA	<i>Indirect enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESBL	Beta lactamases de espectro estendido
FEV1	Volume expiratório forçado em 1 segundo
FIC	<i>Fractional inhibitory concentration</i>
g	Força g
GNNF	Gram negativo não fermentador
IgY	Imunoglobulina Y
IPSCCL	Infecções Primárias Sanguíneas por Cateter confirmadas por Laboratório
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde
ISC	Infecções em Sítio Cirúrgico
ITU	Infecções do Trato Urinário
kDa	Kilo Dalton
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase
KPC-2	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase codificada pelo gene <i>bla</i> _{KPC-2}
LEMRA	Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência Antimicrobiana
M	Molar
N	Normal
mg	Miligrama

MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MHBCA	<i>Mueller-Hinton Broth Cation Adjusted</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
OD	<i>Optical Density</i>
OXA	Oxacilinase
OXA-23	<i>A. baumannii</i> com o gene <i>bla</i> _{OXA-23}
OXA-51	Oxacilinase codificada pelo gene <i>bla</i> _{OXA-51}
OXA-51-like	Oxacilinase codificada pelo gene similar ao <i>bla</i> _{OXA-51}
OXA-143	Oxacilinase codificada pelo gene <i>bla</i> _{OXA-143}
OXA-143-like	Oxacilinase codificada pelo gene similar ao <i>bla</i> _{OXA-143}
OXA-253	<i>A. baumannii</i> com o gene <i>bla</i> _{OXA-253}
PA-SS	Identificador da espécie <i>P. aeruginosa</i>
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPM-1	<i>P. aeruginosa</i> com o gene <i>bla</i> _{SPM-1}
TA	Temperatura ambiente
TSB	<i>Tryptone Soy Broth</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> E <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	17
2.2	PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA BACTERIANA NO BRASIL E NO ESTADO DO PARANÁ PARA <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	18
2.3	<i>BETA-LACTÂMICOS</i> E <i>BETA-LACTAMASES</i>	19
2.4	GENES DE RESISTÊNCIA À CARBAPENÊMICOS EM BGN	20
2.5	CARACTERÍSTICAS DA IGY	22
2.6	APLICAÇÕES DA IGY	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIAS	28
4.1	ISOLADOS E CEPAS	28
4.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA A CARBAPENÊMICOS	29
4.3	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	30
4.4	IMUNIZAÇÕES	31
4.5	OBTENÇÃO DE IGY A PARTIR DA GEMA DE OVO	32
4.6	CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA: TÉCNICA DE SDS PAGE	32
4.7	AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DO IGY ESPECÍFICO COM SEUS ANTÍGENOS POR ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA INDIRETA (ELISA).....	33
4.8	ANÁLISE DA AÇÃO DA IGY CONTRA OS MICRORGANISMOS <i>ACINETOBACTER</i> SPP. E <i>P. AERUGINOSA</i> E MULTIRRESISTENTES	34
4.8	ANÁLISE DO SINERGISMO ENTRE IGY E BETA-LACTÂMICOS CONTRA OS MICRORGANISMOS <i>ACINETOBACTER</i> SPP. E <i>P. AERUGINOSA</i> E MULTIRRESISTENTES.	34
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

5	ARTIGO CIENTÍFICO	36
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias Gram-negativas (BGN) não fermentadoras que causam uma grande preocupação no ambiente hospitalar pela sua resistência intrínseca e por apresentar diferentes tipos de mecanismos de resistência a antibióticos (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

O estudo de Labarca *et al.* (2014) mostrou que a resistência a carbapenêmicos observada nas infecções nosocomiais por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* estão em níveis preocupantes na América Latina. Taxas de resistência a carbapenêmicos de até 90% e 66% para *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, respectivamente, foram observadas nesse estudo.

A resistência a antibióticos dessas duas bactérias tem alertado o sistema de saúde e tem sido associada principalmente ao uso inadequado de antibióticos, como: a aplicação de doses subterapêuticas, terapias empíricas inadequadas ao perfil de resistência da região, uso excessivo e/ou prolongado de antimicrobianos, entre outros (BICKENBACH *et al.*, 2018).

Em 1893, Klemperer foi o primeiro a descrever o efeito protetor de ovos de galinhas imunizadas, evidenciando a transferência de imunoglobulinas do soro para os ovos (*apud* PEREIRA *et al.*, 2019). Desde então, existe na literatura diversos estudos sobre os usos de IgY no tratamento de doenças causadas por vírus e bactérias, na neutralização de venenos por animais peçonhentos e também no imunodiagnóstico de doenças (DA ROCHA, *et al.*, 2017; ETO *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2017; SIFI *et al.*, 2018; TESHAGER *et al.*, 2015; THOMSEN, *et al.*, 2016).

A vantagem de utilizar de anticorpos IgYs provenientes do ovo é a sua fácil produção com redução do sofrimento animal. Quando comparado com os métodos tradicionais para obtenção de imunoglobulinas, proporciona: (I) extração sem estresse para o animal; (II) menor número de animais utilizados na produção; (III) grandes concentrações de anticorpos por gema; (IV) não sofre interferência do fator reumatoide e de proteínas do sistema complemento de mamíferos; e (V) interage apenas com receptores para a região do fragmento cristalizável (Fc) de galinha (SCHADE *et al.*, 1996).

Devido a isso, a utilização de anticorpos IgY foi recomendada em 1996 pelo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM),

como um substituto de imunoglobulinas provenientes de mamíferos na pesquisa e indústria (*apud* SCHADE *et al.*, 1996). O uso deste anticorpo no tratamento de doenças infecciosas demonstra ser outra área promissora, e há vários estudos sobre o uso de IgY como uma terapia passiva oral para doenças gastrointestinais, o que traria poucos efeitos adversos no seu uso (TESHAGER *et al.*, 2015).

Considerando a ação de IgY específicas contra diferentes antígenos, podemos especular sobre sua utilização na prevenção de colonizações e tratamento de infecções. Neste contexto, este estudo buscou avaliar a produção de anticorpos IgY específicos e sua ação conjunta com antimicrobianos beta-lactâmicos contra os microrganismos *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *ACINETOBACTER BAUMANNII*

A bactéria *P. aeruginosa* é um microrganismo procarionte com formato de bastonete, Gram negativa e pertencente a ordem *Pseudomonadales*, possui flagelo polar e pode ter *pili* (ou chamado também de tufo) (TORTORA *et al.*, 2005). Apresenta crescimento estritamente aeróbio, porém existem casos especiais com crescimento anaeróbio quando fornecido fontes de nitrato (COHEN *et al.*, 2016). O gênero *Pseudomonas* spp. apresenta oxidase positiva e cresce em temperaturas entre 28 e 42°C, sendo característica específica e diferencial da espécie *P. aeruginosa* crescimento a 42°C (COHEN *et al.*, 2016). É também característica deste grupo a produção de pigmentos como a pioverdina, piocianina, piorubina e piomelanina (*P. aeruginosa* pode produzir todos estes mencionados) (COHEN *et al.*, 2016).

O gênero *Acinetobacter* spp. são coco bacilos aeróbicos Gram negativos, não fermentadores e oxidase negativa, podendo crescer em temperaturas variando de 20 a 44°C (COHEN *et al.*, 2016). É característico e diferencial da espécie *A. baumannii* a presença do gene *bla_{OXA-51}-LIKE* (TURTON *et al.*, 2006).

Ambas as bactérias mencionadas, podem ser encontradas em ambientes hospitalares e na comunidade. Crone e colaboradores (2020) examinaram amostras ambientais e também fizeram uma meta-análise da literatura existente, onde concluíram que a presença do *P. aeruginosa* pode ser encontrada no meio ambiente em amostras de solo e água. Porém eles associaram a sua presença com regiões onde havia atividades humanas, sugerindo que o ser humano seria a fonte de contaminação ambiental de *P. aeruginosa*.

Com relação à *A. baumannii*, Eveillard e colaboradores (2013) também evidenciaram vários relatos na literatura mostrando a presença de *A. baumannii* em amostras de solo, vegetais e água, porém ainda não existe uma relação concreta se a presença humana poderia ter algum papel nos reservatórios extra hospitalares deste microrganismo.

Ainda que ocorra a presença na natureza destas bactérias, é no cenário hospitalar que se tornam preocupantes. Ambas vem sendo associadas a altos índices de resistência a antimicrobianos (ANVISA, 2018b).

2.2 PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA BACTERIANA NO BRASIL E NO ESTADO DO PARANÁ PARA *ACINETOBACTER BAUMANNII* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

A agência nacional de vigilância sanitária do Brasil (ANVISA), publicou um boletim informativo com indicadores nacionais de infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) e resistência medicamentosa de 2018 (ANVISA, 2018a). Nesse boletim é evidenciado que em 2018, nas infecções primárias sanguíneas por cateter confirmadas por laboratório (IPSCCL), a resistência estava presente em 79% dos casos na UTI adulta para *A. baumannii* e 41% dos casos para *P. aeruginosa*.

A secretaria de estado da saúde do Paraná também publicou em 2018 um boletim informativo, onde descreveu os indicadores estaduais sobre IRAS e resistência microbiana do período de janeiro a junho de 2018 (ANVISA, 2018b). Neste boletim foi mostrado que a taxa global é 1,59% para IRAS, sendo que 11,29% destes pacientes vão a óbito. A presença de resistência a antimicrobianos foi de 49,21% dos casos de IRAS no estado do Paraná, sendo que no município de Londrina (PR) esse número sobe para 62,09% (ANVISA, 2018b).

Sobre a distribuição da resistência nas classes de microrganismos, foi encontrado principalmente nos Gram negativos fermentadores, responsáveis por 49% do total de casos no paraná (ANVISA, 2018b). Porém os Gram negativo não fermentadores (GNNF) também respondem a uma grande fatia na porcentagem com 22% de resistência. Na classificação geral da prevalência de bactérias nos hospitais, as bactérias GNNF *P. aeruginosa* e *A. baumannii* estão na quarta e quinta colocação, respectivamente (ANVISA, 2018b).

Para *A. baumannii* encontramos prevalência de resistência importante em pneumonias (64,4% do total), seguido por IPSCCL (19,26%), infecções em sítio cirúrgico (ISC) (8,76%) e infecções do trato urinário (ITU) (7,58%) (ANVISA, 2018b). Já a *P. aeruginosa* também apresentou prevalência de resistência nas pneumonias (48,26%), seguido por ITU (21,39%), ISC (16,73%) e IPSCCL (13,62%) (ANVISA, 2018b).

Estes dados junto aos parâmetros encontrados de resistência microbiana, leva ao sistema de saúde a necessidade do controle e fiscalização do

uso de antimicrobianos. Esse controle já vem sendo implementado no Paraná, e os indicadores mostraram um alto consumo de antimicrobianos de espectro estendido (sulfabactam e ampicilina, cefalosporinas de terceira e quarta geração) e carbapenêmicos (meropenem) (ANVISA, 2018b). O consumo global (dose diária definida/1000 pacientes) no Paraná em 2018 pelos hospitais foi de 2,08 para imipenem, meropenem 43,08 e ceftazidima 3.51 (ANVISA, 2018b).

2.3 BETA-LACTÂMICOS E BETA-LACTAMASES

Após a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, surgiram outras substâncias pertencentes a mesma classe. Elas se dividem em quatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, e monobactam (TOOKE *et al.*, 2019).

Estruturalmente possuem em comum um anel bicíclico (chamado também de anel beta-lactâmico; Fig. 1), que é o responsável pelo seu mecanismo de ação antibacteriano. Através da reação inibitória deste anel com as proteínas ligadoras de penicilina da bactéria (PBP – *penicillin binding protein*), a formação da parede de peptidoglicana é suspensa e a bactéria morre (TOOKE *et al.*, 2019).

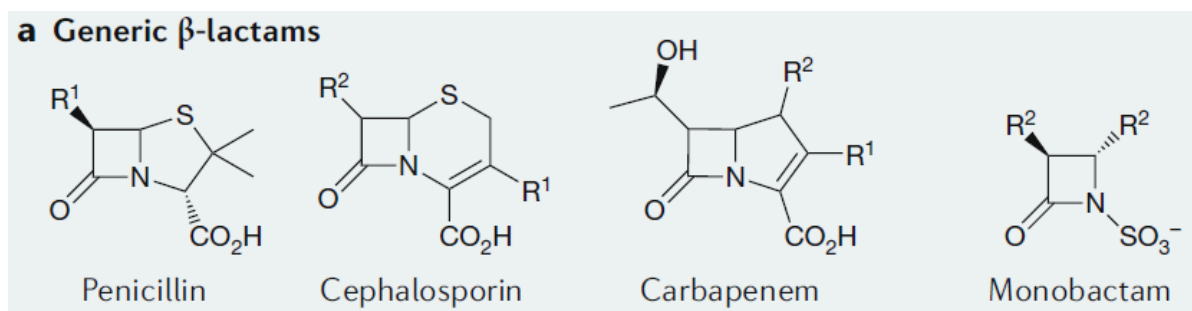


Fig. 1: Estrutura genérica das diferentes classes de beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactam. Fonte: figura parcial retirada do artigo de BUSH e BRADFORD (2019).

Os mecanismos de resistência a essas substâncias em BGN é devido principalmente a produção de beta-lactamases, nas quais são capazes de inativar os beta-lactâmicos através da hidrólise do anel bicíclico (TOOKE *et al.*, 2019). Segundo a classificação molecular de Ambler, existem 4 classes de beta-lactamases (de A a D) que variam em relação aos seus mecanismo de hidrólise (BUSH e BRADFORD, 2019; TOOKE *et al.*, 2019).

A classe A são as serino beta-lactamases, na qual entram as penicilinases, as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e serino carbapenemases (BUSH e BRADFORD, 2019). No grupo B estão as metallo-beta-lactamases, que tem como distinção a presença de uma ou duas moléculas de zinco em seu sítio ativo (BUSH e BRADFORD, 2019). A beta-lactamases do tipo AmpC são da classe C, e fornecem resistência a todos os tipos de cefalosporinas (BUSH e BRADFORD, 2019). E por último, temos o grupo D, que é o das oxacilinases e podem conferir resistência a todos os tipos de beta-lactâmicos (BUSH e BRADFORD, 2019).

2.4 GENES DE RESISTÊNCIA À CARBAPENÊMICOS EM BGN

A Organização Mundial de Saúde (WHO) publicou uma lista em 2017, de patógenos preocupantes onde entraram tanto o *A. baumannii* quanto a *P. aeruginosa* carbapenem resistentes como patógenos de prioridade máxima (WHO, 2017).

Existem diferentes tipos de mecanismos de resistência a antimicrobianos, como presença de bombas de efluxo, diminuição de porinas, beta-lactamases, enzimas modificadora de aminoglicosídeos, alteração e mutação do alvo do antibiótico, entre outros (GUITOR, WRIGHT, 2018). Estes mecanismos de resistência têm duas possíveis fontes em um microrganismo: transferência vertical (mutações em seu cromossoma e passado por replicação) ou por transferência horizontal (conjugação, transdução e transformação natural) (RUPPEÉ *et al.*, 2015; LERMINIAUX e CAMERON, 2019).

Os genes de resistência que são transferidos por plasmídeos, são a principal fonte de preocupação atualmente, pois são de rápida disseminação em um ambiente hospitalar (LERMINIAUX e CAMERON, 2019). Estes podem carregar mais de um gene de resistência, podendo levar a formação dos chamados patógenos multirresistentes (resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos) e limitar o tratamento terapêutico (LERMINIAUX e CAMERON, 2019).

A principal forma de transferência de plasmídeos é por conjugação, porém pode também ser passado por transdução e transformação natural (LERMINIAUX e CAMERON, 2019). A conjugação é quando duas bactérias se comunicam por contato, formando uma ponte de comunicação, onde o plasmídeo é

passado de uma para outra. Lerminiaux e Cameron (2019) citam que é muito comum a transferência de genes para ESBL através deste mecanismo inter e entre espécies.

Os plasmídeos são muito vinculados a surtos de cepas resistentes em ambiente hospitalar, sendo difícil a sua contenção, justamente pela sua facilidade de transmissão. Um exemplo disto são os surtos causados pela *Klebsiella pneumoniae* e o gene *bla_{KPC-2}* (CONLAN *et al.*, 2014; MATHERS *et al.*, 2011; TOFTELAND *et al.*, 2013), que até hoje está presente no cenário hospitalar de diversos países (ZHANG *et al.*, 2020).

A presença de enzimas *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) é mundial e com maior frequência em *Klebsiella pneumoniae*, porém já foram relatadas em outras espécies (CARRARA-MARRONI *et al.*, 2015; KOPOTSA *et al.*, 2019). No Brasil existe principalmente a presença da variante KPC codificada pelo gene *bla_{KPC-2}* (KPC-2) (CARRARA-MARRONI *et al.*, 2015; SAMPAIO e GALES, 2016). A enzima KPC-2 é capaz de inativar todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas e pertence à classe A das serino- β -lactamases (CARRARA-MARRONI *et al.*, 2015; TOOKE *et al.*, 2019).

Já a enzima São Paulo metalo-beta-lactamase (SPM) é uma β -lactamase de classe B, sendo também chamada de metalo- β -lactamase ou ainda enzimas zinco dependentes. Essas enzimas possuem como diferencial com as outras classes de beta-lactamases, a presença de um metal em seu centro proteico (TOLEMAN *et al.*, 2002; TOOKE *et al.*, 2019). A ocorrência da SPM codificada pelo gene *bla_{SPM-1}* é alta no Brasil e apresenta resistência a todos os β -lactâmicos, até carbapenêmicos e ceftazidima (GALES *et al.*, 2003).

A *P. aeruginosa* é produtora natural de cefalosporinas tipo AmpC, que são induzidas na presença de antibióticos, lhe conferindo a resistência a alguns beta-lactâmicos e cefalosporinas, exceto por cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenêmicos. Porém quando há a hiper expressão desta enzima, a bactéria se torna resistente a essas outras classes, exceto pelos carbapenêmicos (RUPPÉ *et al.*, 2015).

Além desse mecanismo de resistência, também existe a super expressão de bombas de efluxo, como no sistema MexAb-OprM (RUPPÉ *et al.*, 2015). A perda de porinas, como o OprD, também pode levar a resistência a imipenem (RUPPÉ *et al.*, 2015).

Assim como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* produz naturalmente cefalosporinases do tipo AmpC e oxacilinas (OXA), sendo intrínseco e característico da espécie, enzimas oxacilinas codificada pelo gene similar ao *bla_{OXA-51}* (OXA-51-like) (RUPPÉ *et al.*, 2015; TURTON *et al.*, 2006). Essa característica lhe confere resistência natural a penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração e aztreonam (RUPPÉ *et al.*, 2015). Além desses mecanismos de resistência, outros também podem ser encontrados, como perda de porinas, bombas de efluxo e modificações de alvos, sendo muito comum encontrarmos um perfil multirresistente deste microrganismo (RUPPÉ *et al.*, 2015).

Outra preocupação é o aparecimento cada vez mais comum de *A. baumannii* carbapenem resistente, que se somado a outros mecanismos de resistência, pode levar até ao surgimento de panresistência (resistência a todas as classes de antibióticos) (SHI *et al.*, 2017). O perfil de resistência a carbapenêmicos pode ser devido a hiper expressão de enzimas OXA-51-like, em menor frequência, ou devido a aquisição (via plasmídeos) de enzimas oxacilinas codificada pelo gene similar ao *bla_{OXA-23}* (OXA-23-like) (RUPPÉ *et al.*, 2015).

O primeiro relato da presença de oxacilinas codificada pelo gene *bla_{OXA-143}* (OXA-143), classificado como uma beta lactamases de classe D, foi em 2004 em cepas de *A. baumannii* de hospitais brasileiros (HIGGINS *et al.*, 2010). Na literatura, vemos a prevalência desse gene em *Acinetobacter* spp. com variáveis taxas, desde 8,4% até 76% (WERNECK, *et al.*, 2011; ANTONIO *et al.*, 2011; MOSTACHIO *et al.*, 2012).

Em um estudo de 10 anos (2006 a 2016) em um hospital de Londrina (Paraná, Brasil) foi encontrado em *A. baumannii* uma prevalência de 97,9% para o gene *bla_{OXA-23-LIKE}*, 2,1% para *bla_{OXA-143-LIKE}*, sendo que nestes foi encontrado uma variante da OXA-143, o gene *bla_{OXA-253-LIKE}* (ROMANIN *et al.*, 2019).

2.5 CARACTERÍSTICAS DA IGY

Nas aves encontramos três tipos de imunoglobulinas, IgA, IgM e IgY (LEE *et al.*, 2017). A IgY é uma imunoglobulina que também é encontrada em reptéis e anfíbios, porém é presente em maiores concentrações apenas no soro de aves (ZHANG *et al.*, 2017). Nestas atuam com a função semelhante a IgG humana, neutralizando antígenos e ativando leucócitos (TAYLOR *et al.*, 2010; LEE *et al.*,

2017).

Essa imunoglobulina se assemelha estruturalmente às imunoglobulinas IgG e IgE e inclusive é proposto em estudos que seria a precursora dessas biomoléculas (TAYLOR *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.* 2008). Apesar da sua semelhança com a IgG de mamíferos ela possui diferenças moleculares, que se encontram nas regiões constantes.

A IgY é uma imunoglobulina de 180kDa, apresenta duas cadeias leves e duas pesadas, sendo ligadas por pontes dissulfeto (fig. 1). As cadeias leves possuem duas regiões variáveis e uma constante, e a cadeia pesada tem quatro regiões constantes. Entre as regiões C_{H1} e C_{H2}, e outra entre C_{H2} e C_{H3}, tem resíduos de glicina e prolina lhe conferindo certa inflexibilidade em comparação a IgG humana, porém, se assemelha com a IgE humana (MA e O'KENNEDY, 2015).

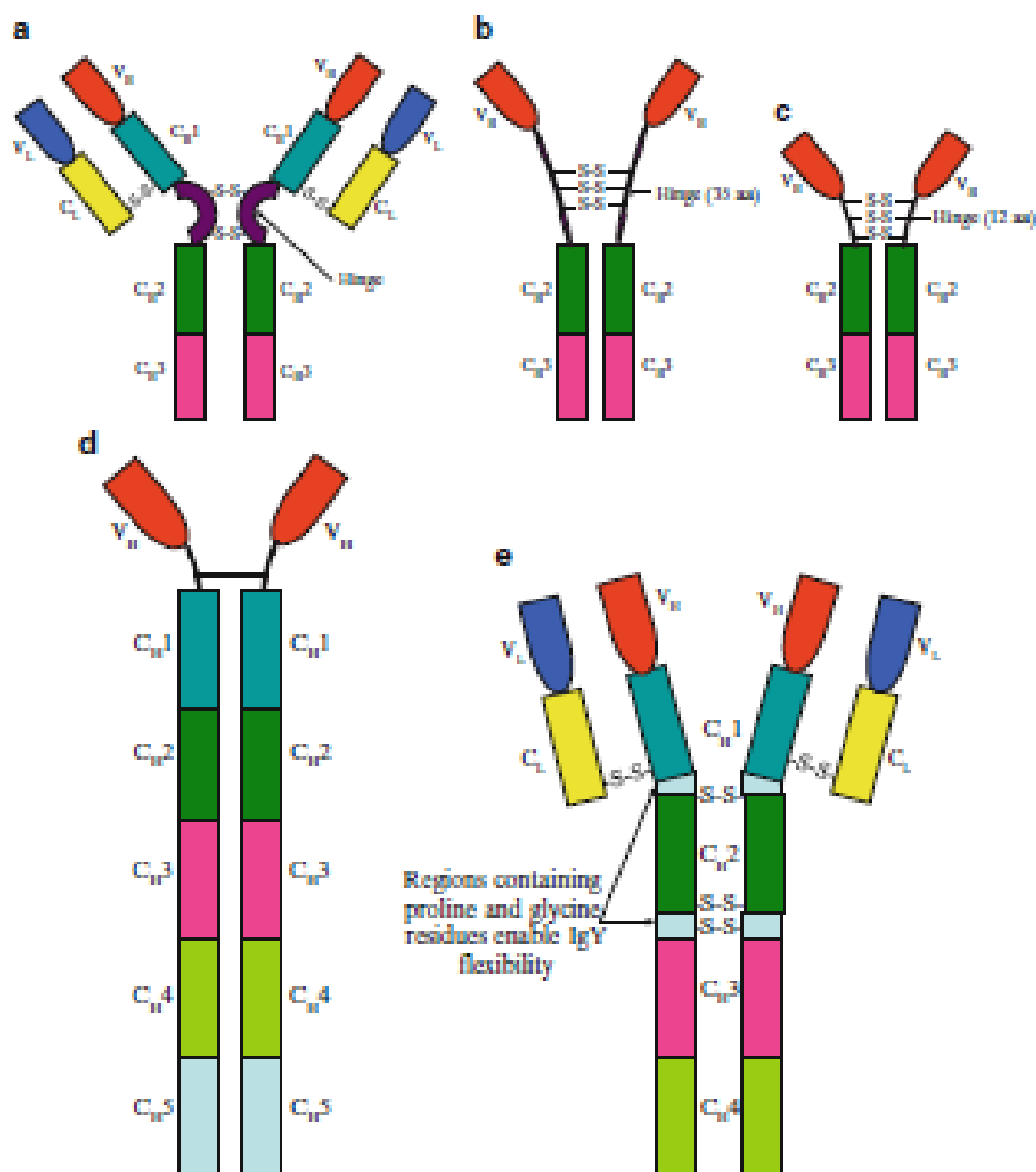


Fig. 2: Estrutura básica de imunoglobulinas. (a) mostra a estrutura básica de uma imunoglobulina monômero. (b-d) mostra a estrutura da IgG2 Camelidae (b) IgG3 Camelidae, e (c) anticorpo IgY aviário. NH 2 = grupo amino; COOH = grupo ácido carboxílico; V H = região variável da cadeia pesada do anticorpo; V L = região variável da cadeia leve do anticorpo; C L = região constante da cadeia leve do anticorpo; C H 1,2,3,4,5 = domínio constante um, dois, três, quarto, cinco da cadeia pesada do anticorpo; S-S = ligação dissulfídica e aa = amino ácido. Fonte: figura e legenda traduzida retirada do artigo de MA e O'KENNEDY (2015).

Na literatura é descrito a existência de um isômero da IgY, chamado de IgY Δ Fc com tamanho de 120 kDa, na qual há a ausência parcial da cadeia pesada, e tem papel impedir a fagocitose em infecções virais, impedindo a replicação viral nas aves (ZHANG *et al.*, 2017). Este isômero aparece em algumas aves, como patos e gansos, porém não existe nas galinhas (TIZARD, 2014).

IgY é conhecida por ser passada do soro da ave para a gema do

ovo, assumindo a função de imunidade passiva para o embrião quando este eclode (TIZARD, 2014). A IgY é transferida quando o ovo ainda está no ovário, já a IgM e a IgA maternas são absorvidas na descida pelo oviduto por meio de secreções e junto com a ovalbumina (TIZARD, 2014). Durante o crescimento do embrião ele absorve a IgY, presente na gema, e engole a IgA e IgM difundidas no líquido amniótico, o que resulta na presença dessas biomoléculas no intestino e a IgY no soro podendo durar entre 10-20 dias no pintainho recém eclodido (TIZARD, 2014).

Sua estabilidade fora do corpo é mantida em temperaturas de até 40°C por 10 minutos, e em 60°C, pode perder até 20% de sua atividade (SHIN *et al.*, 2002). Já em relação ao pH, é estável de 4 a 8 (SHIN *et al.*, 2002). Devido a distância filogenética entre a galinha e mamíferos, nestes a IgY não desencadeia a ativação do sistema complemento e não se liga à receptores Fc de anticorpos (LEIVA, *et al.*, 2020).

2.6 APLICAÇÕES DA IgY

Desde a década de 80 a IgY vem sendo muito estudada sobre suas diversas funções e aplicações práticas, que variam entre diagnóstico de doenças, neutralização de toxinas e venenos e combate de infecções por microrganismos em humanos e animais (PEREIRA *et al.* 2019).

Os métodos mais usuais para produções de anticorpos utilizam animais como cavalos e coelhos. Como método de obtenção é pela sangria, além do sofrimento animal gerado, estes animais necessitam de um período de descanso grande entre as coletas. Considerando os princípios dos 3 R (*replacement, reduction and refinement*) de Russel e Burch (1959 *apud* TANNENBAUM e BENNETT, 2015) que visam a diminuição do sofrimento de animais experimentais, alternativas se mostram necessárias para a produção e obtenção de anticorpos.

O *European Centre for the Validation of Alternative Methods* recomendou em 1996 o uso da IgY como um substituto para esses métodos (*apud* SCHADE *et al.*, 1996). Existem muitos estudos que visam a substituição dos métodos convencionais para o uso da IgY como imunização passiva em acidentes com animais peçonhentos como víboras, cobras e escorpiões (DE ANDRADE *et al.*, 2013; DA ROCHA, *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; SIFI *et al.*, 2018; BORGES *et al.*, 2018; ETO *et al.*, 2018; LEIVA *et al.*, 2019).

Outra aplicação é o seu uso no diagnóstico de doenças pela facilidade de sua obtenção quando comparado a outras imunoglobulinas e ampla possibilidade de uso de antígenos. Um exemplo é o desenvolvimento de um teste para a detecção de estrogiloidíase (DE FARIA *et al.*, 2019), onde foi visto uma alta sensibilidade e especificidade para a detecção de antígenos de diferentes estágios larvais do verme. Também existe a produção de kits para a detecção de *Vibrio cholerae* toxigênica, onde em países com pessoas em situações mais críticas se faz de extrema importância para prevenir e combater surtos (BAYAT, KHABIRI e HEMATI, 2018; BARATI, EBRAHIMI e NAZARIAN, 2018).

Mais recentemente, devido a pandemia do vírus SARS CoV-2 foi sugerido por Somasundaram e colaboradores (2020) o seu uso para o diagnóstico de COVID-19 através da proteína *spike* e também como uma possível alternativa para o tratamento, enquanto ainda não temos uma vacina segura e eficaz. Na literatura já foi relatado o seu uso contra outros vírus, como Zika em humanos (MWALE *et al.*, 2020); Influenza A em suínos (DA SILVA *et al.*, 2018) e enterites causadas por rotavírus (WANG *et al.*, 2019b).

Em relação a seu uso no combate de doenças causadas por bactérias, há estudos com *Mycobacterium tuberculosis* (SUDJARWO *et al.*, 2015); *Campylobacter jejuni* (THIBODEAU *et al.*, 2017); *Helicobacter pylori* (SOLHI *et al.*, 2017); *Porphyromonas gingivalis* (WANG *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018; QIAO *et al.*, 2018); *Fusobacterium nucleatum* (WANG *et al.*, 2019a); *Vibrio cholerae* (AKBARI *et al.*, 2018); *Salmonella* spp. (HATAMZADE ISFAHANI *et al.*, 2020); *Pseudomonas aeruginosa* (NILSSON *et al.*, 2008; RANJBAR *et al.*, 2019; THOMSEN *et al.*, 2016) e *Acinetobacter baumannii* (SHI *et al.*, 2017).

Mas nem sempre há o sucesso do uso de IgY no combate de infecções, como no estudo de Soumaila Garba e colaboradores (2019) no uso de IgY específicas contra *Campylobacter jejuni*. Eles tiveram bons resultados *in vitro* porém ao testarem *in vivo* a administração da bactéria e a IgY em pó adicionada à ração, não preveniu ou reduziu a infecção por *C. jejuni*.

Existem alguns estudos do uso de IgY e *P. aeruginosa*. Um deles é o feito por Nilsson e colaboradores (2008), que realizaram um estudo clínico em pacientes com fibrose cística e o uso de anti-*P. aeruginosa* IgY na forma de enxaguante bucal para prevenção de infecções por este microrganismo. Eles observaram que os pacientes tratados com a IgY não tiveram nenhuma infecção

crônica por *P. aeruginosa*, melhor média de volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV1) e flora bacteriana bucal comparável com pacientes mais jovens (antes de serem infectados com *P. aeruginosa*).

Outro estudo deste mesmo grupo, apontou que a produção de IgY contra *P. aeruginosa*, tem caráter policlonal e atua principalmente contra flagelina, uma proteína em grande abundância no flagelo das *P. aeruginosa* (NILSSON *et al.*, 2007). O flagelo é essencial para a motilidade e quimiotaxia dessa bactéria, sendo um fator de virulência importante (TORTORA *et al.*, 2005; NILSSON *et al.*, 2007).

O estudo de Shi e colaboradores (2017) é um dos primeiros a avaliar a ação de IgY específicas contra *A. baumannii* panresistente. Eles avaliaram duas cepas resistentes, uma de origem hospitalar e outra ATCC® BAA1605. Foi observado inibição do crescimento (dose-dependente) das cepas quando associadas às IgY específicas. Houve variação entre as inibições de crescimento, sendo que a IgY produzida a partir da ATCC® BAA1605 teve uma maior inibição quando em contato com seu antígeno próprio (em uma concentração de 20 mg/mL) e menor com a cepa de origem clínica.

Além da inibição do crescimento, nesse estudo foi realizada microscopia eletrônica das IgYs obtidas e seus respectivos antígenos. Houve a presença de crenação, modificações estruturais e agregação das bactérias.

Eles também utilizaram um modelo murino para avaliar a ação *in vivo*. Foi induzido pneumonia por *A. baumannii* e utilizado as IgYs específicas. Em relação ao controle, houve redução da mortalidade em 8,3%, diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β , ausência de infiltrado inflamatório e apenas leve edema alveolar no tecido pulmonar. Os autores concluíram que o uso de IgYs específicas poderiam ser uma nova abordagem terapêutica já que obtiveram inibição do crescimento *in vitro* e proteção de murinos contra a pneumonia aguda induzida por *A. baumannii*.

Todas as evidências apresentadas acima sustentam a investigação do uso de IgY no controle de doenças infecciosas, tanto para diagnóstico quanto para a abordagem terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a produção de anticorpos específicos e suas interações com beta-lactâmicos contra *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos ceftazidima, meropenem e imipenem contra isolados de cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes;
- Obter anticorpos IgY anti-*A. baumannii* e anti-*P. aeruginosa* multirresistentes;
- Caracterizar imunoquimicamente os anticorpos IgY específicos obtidos;
- Avaliar a ação antibacteriana dos anticorpos IgY anti-*A. baumannii* e anti-*P. aeruginosa* multirresistentes.

4 METODOLOGIAS

4.1 ISOLADOS E CEPAS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para o uso de animais (CEUA n°: 5459.2019.94). Os isolados de *A. baumannii* (*bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-253}) e *P. aeruginosa* (*bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC-2}) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência Antimicrobiana (LEMRA), localizado no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da UEL (Londrina, Paraná/Brasil).

Foram utilizados também cepas ATCC®: *A. baumannii* ATCC® 19606, *P. aeruginosa* ATCC®27853 e *Escherichia coli* ATCC® 25922. Cepas de qualidade foram usadas como parte do estudo (ATCC® 19606 e ATCC® 27853) e/ou como controle de qualidade em ensaios de teste de sensibilidade (ATCC® 27853 e ATCC® 25922). As cepas e suas funções estão descritas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Cepas utilizadas e suas funções neste trabalho.

Cepas (nomes dados no trabalho)	Espécie	Gene de resistência	Aplicação da cepa
ATCC® 19606	<i>A. baumannii</i>	n/a	Amostra
ATCC® 27853	<i>P. aeruginosa</i>	n/a	Controle e amostra
ATCC® 25922	<i>E. coli</i>	n/a	Controle
OXA-23	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	Amostra
OXA-253	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-253}	Amostra
SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{SPM-1}	Amostra
KPC-2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	Amostra

Fonte: o próprio autor. n/a – não se aplica; OXA-23 – *A. baumannii* com o gene *bla*_{OXA-23}; OXA-253 – *A. baumannii* com o gene *bla*_{OXA-253}; SPM-1 – *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1}; KPC-2 – *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{KPC-2}.

Os estoques de isolados de *A. baumannii* com os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-253}, *P. aeruginosa* com os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC-2} e cepas *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *A. baumannii* ATCC® 19606 foram transferidos do estoque para meio *Tryptone Soy Broth* (TSB) e incubadas a 37°C ± 2°C de 16-24 horas. Posteriormente, as amostras foram semeadas em placas de meio Mueller-Hinton Agar (MHA) e incubadas a 37°C ± 2°C de 16-24 horas novamente.

Depois foi realizada a suspensão direta destas colônias isoladas (em MHA) para meio caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHBCA), ajustando a sua turbidez para 0,5 da escala de McFarland através de turbidímetro (DensiCHEK TM

Plus bioMérieux® AS). Para avaliação CIM, da atividade da IgY e do sinergismo entre IgY e os antimicrobianos, esta solução bacteriana foi então diluída 1:100 em MHBCA.

4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA A CARBAPENÊMICOS

Os genes de resistência tiveram a presença confirmada em cada um dos seus respectivos isolados. A extração de DNA bacteriano foi realizada por fervura pela técnica adaptada de Donald *et al.* (2000) e de Vaneechoute *et al.* (1995), respectivamente para as cepas de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.

Com a utilização de controles positivos em cada teste, foi avaliada a presença dos genes de resistência nas cepas. Para o gene *bla*_{OXA-51}, utilizado na identificação de todos os *A. baumannii* foi utilizada a técnica de Woodford *et al.* (2006), assim como para o gene *bla*_{OXA-23}. Para a detecção do gene *bla*_{OXA-253} (que é *bla*_{OXA-143-LIKE}) foi utilizada a técnica de Romanin *et al.* (2019).

Nos isolados de *P. aeruginosa* o gene *bla*_{SPM-1} foi confirmado de acordo com a técnica de Mendes *et al.* (2007) e para o gene *bla*_{KPC-2} foi utilizado o protocolo de Doyle *et al.* (2012). Para confirmação da espécie *P. aeruginosa*, foi utilizado o protocolo de Spilker *et al.* (2004). Os resultados da PCR foram analisados em gel de agarose a 0,8% com o marcador de DNA KASVI® 1kb (modelo: K9-1000L).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos usados para as reações de PCR.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' – 3')	TA (°C)	Tamanho do fragmento (bp)	Referência
KPC F	TGTCACTGTATCG CCGTC	60	900	DOYLE <i>et al.</i> , 2012
KPC R	CTCAGTGCTCTAC AGAAAACC			
OXA-23 F	GATCGGATTGGAG AACCAGA	52	501	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
OXA-23 R	ATTTCTGACCGCA TTTCCAT			
OXA-51 F	TAATGCTTTGATC GGCCTTG	52	353	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
OXA-51 R	TGGATTGCACTTC ATCTTGG			
OXA-143-F	CAGCATTCTACT CTACTTTC	50	762	ROMANIN <i>et al.</i> , 2019
OXA-143-R	TCATTACGAATAG AACCAG			
PA-SS-F	GGGGGATCTTCG GACCTCA	58	956	SPILKER <i>et al.</i> , 2004
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCC CACCCG			
SPM-1 F	CTAAATCGAGAGC CCTGCTTG	53	798	MENDES <i>et al.</i> , 2007
SPM-1 R	CCTTTTCCGCGAC CTTGATC			

Fonte: o próprio autor. TA – temperatura de amplificação; °C – temperatura em graus Celsius; bp – pares de base; F – *forward*; R – *reverse*; KPC - *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase codificada pelo gene *bla*_{KPC-2}; OXA-23 - oxacilinase codificada pelo gene *bla*_{OXA-23}; OXA-51 - Oxacilinase codificada pelo gene *bla*_{OXA-51}; OXA-143 oxacilinase codificada pelo gene *bla*_{OXA-143}; PA-SS – identificador da espécie *P. aeruginosa*; SPM-1 - *P. aeruginosa* com o gene *bla*_{SPM-1}.

4.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM dos antimicrobianos ceftazidima, meropenem e imipenem foi realizada de acordo com o protocolo do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2020 (CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020).

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 50 µL de

MHBCA em cada poço nas colunas de 1 a 12. A seguir foram incorporados 50 µL/poço dos antibióticos a serem avaliados, que foram devidamente preparados conforme as especificações do fabricante, filtrados e esterilizados em filtro Milipore MILEX® 0,22 µm previamente e na concentração de 2048 µg/mL para ceftazidima e 512 µg/mL para meropenem e imipenem. Que foram adicionados na coluna 1, e a partir deste foi realizada a diluição seriada (1:2) até a coluna 10. Os 50 µl restantes da diluição seriada foram adicionados aos poços da coluna do controle de esterilidade (coluna 12). Posteriormente, 50 µL/poço da solução bacteriana (descrita no item 4.1) foram adicionados nas colunas de 1 a 10 e na coluna do controle de crescimento (coluna 11). A microplaca foi homogeneizada e incubada a 37°C ± 2°C por 21-24 horas. A leitura foi realizada visualmente, detectando ou ausência de crescimento do microrganismo.

4.4 IMUNIZAÇÕES

Para a produção das IgY específicas foram utilizadas 12 galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*), sendo dois animais por isolado testado. Os animais foram gentilmente cedidos pela Fazenda Escola da UEL (Londrina, Paraná/Brasil). Os animais, de aproximadamente 20 semanas, foram mantidos em gaiolas individuais à temperatura ambiente, em ciclo de 17 horas de luz com comida (Ração para poedeiras, purina, Brasil) e água *ad libitum*.

Para os inóculos, *P. aeruginosa* genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC-2} e *A. baumannii* com os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-253}, assim como os controles de qualidade *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *A. baumannii* ATCC® 19606 foram incubados em caldo TSB por 24 horas a 37°C e inativados por formaldeído a 1,5% e banho-maria 68°C por 1 hora. Os inóculos foram centrifugados a 2650 g por 10 minutos, lavados com 5 mL de tampão fosfato (PBS) 1X e novamente centrifugados, foi realizada a retirada do sobrenadante e diluído o precipitado formado em 5 mL de PBS 1X glicerol 40% e congelado a -20°C até o momento do uso. Após este procedimento foi realizado o teste de esterilidade, para validar a inativação das bactérias, através da passagem de 10 µl e estriamento para placas de CHROMagar® (*Chromogenic culture media*).

Nos dias de imunização foi realizada a lavagem dos inóculos com solução salina (NaCl 0,9%) para a retirada do glicerol, que ocorreu por meio da

centrifugação por 15 minutos a 14.100 g, descarte do sobrenadante, lavagem com o mesmo volume de salina 0,9% e repetição da centrifugação. Após foi realizado o ajuste da turbidez, como realizado no item 4.1, porém em salina e para turbidez de 2.0 da escala de McFarland (equivalente a 6×10^8 UFC/mL).

Os animais receberam sete doses, intramuscular, do inóculo em salina (500 μ L/ animal dividido em duas regiões no peitoral, 3×10^8 UFC/mL/ animal) nos dias 1, 15, 30, 45, 90, 135 e 180 do experimento. Os ovos foram coletados antes das imunizações e a partir de sete dias após a terceira, quinta e sétima imunização (e coletados por um período de sete dias) e armazenados à 4°C por no máximo um mês (DE ANDRADE *et al.*, 2013).

4.5 OBTENÇÃO DE IGY A PARTIR DA GEMA DO OVO

Os anticorpos IgY foram obtidos pelo método de precipitação por sulfato de amônio modificado (AKITA; NAKAI, 1992). As gemas foram separadas da clara, lavadas com água destilada, e diluídas 1:7 em água acidificada pH 2,5. Após esse procedimento o pH foi ajustado entre 5,00 e 5,20 e deixado à 4°C *overnight* ou por no mínimo 6 horas para a formação de camada bifásica. As partes superior e inferior foram filtradas em papel Whatmann nº 1 a 4 a 8°C e precipitada por adição de sulfato de amônio saturado para 33% final.

A solução foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente (TA) por 30 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada (5000 g, 20 minutos, TA) e o sedimento obtido, dissolvido em sulfato de sódio 18% (aproximadamente 2 mL/gema usada) e incubado por 20 minutos, sob agitação a TA. Após nova centrifugação (5000 g, 20 minutos, TA), o precipitado obtido foi dissolvido em sulfato de sódio 14% e incubado por 20 min, sob agitação, a TA. A solução foi novamente centrifugada a 5000 g por 20 minutos, TA. O precipitado resultante foi então dissolvido em PBS 1X (pH 7,4) e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.6 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA: TÉCNICA DE SDS PAGE

Para verificar a concentração de IgY obtida pelo método descrito no item 4.5, foi utilizado o método adaptado de Bradford (1976) e sua pureza determinada por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE - *Sodium dodecyl*

sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 10%, corado com Coomassie Blue (LAEMMLI, 1970). Sucintamente, na dosagem de proteínas é utilizado como padrão uma curva de albumina bovina do soro, com concentrações conhecidas. Sendo aplicado em microplaca 10 µL/poço da curva ou da amostra e adicionado 150 µL/poço do reagente de Bradford, após homogeneização, a leitura é realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para a eletroforese de proteínas, foi utilizado um marcador de proteínas de tamanho entre 6 e 180 kDa (BenchMark®, ref. 10747-012).

4.7 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DO IGY ESPECÍFICO COM SEUS ANTÍGENOS POR ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA INDIRETA (ELISA)

Em microplaca de 96 poços com fundo chato de alta afinidade foram adicionados 100 µL/poço do microrganismo inativado (preparado como descrito no item 4.1, porém foi ajustado para uma turbidez de 4.0 na escala de McFarland e no dia do uso diluído para $6,25 \times 10^6$ UFC/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6), e incubado *overnight* a 4 a 8°C em câmara úmida. Foi realizado o bloqueio com 100 µL/poço de leite em pó desnatado 5%/PBS 1 X e incubado 37°C ± 2°C por 2 horas em câmara úmida. A seguir, foi lavado com 200 µL/poço de PBS 1 X e adicionado 100 µL/poço da amostra com a IgY (em duplicata) em leite em pó desnatado 1%/PBS 1X (em concentrações iniciais variando entre 1,60 mg/mL até 0,003125 mg/mL), incubando por 1 hora a 37°C ± 2°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens seguidas com 200 µL/poço de PBS 1X com Tween 20 (0,05%), com intervalos de 5 min (totalizando 15 minutos), descartando o excesso. Após foi colocado 100 µL/poço do conjugado 1:40000 (*Anti chicken IgY whole molecule Peroxidase, produced in rabbit*, ref. A9046 sigma®) em leite em pó desnatado 1%/PBS 1X e incubado a 37°C ± 2°C por 1 hora. Novamente foi repetido o processo de lavagem descrito acima. Foi adicionado 100 µL/poço do substrato 1x (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMBZ) 0,1mg/mL e Peróxido de hidrogênio 0,03% em tampão citrato 0,1M pH 5,0) e incubado por 15 minutos para *A. baumannii* e 20 min para *P. aeruginosa* em ausência de luz. Ao final foi adicionado 50 µL/poço de solução stop (ácido sulfúrico 2N) e a leitura realizada a 450 nm em espectrofotômetro.

Este procedimento foi realizado em triplicata para todas as coletas (pré-imune, 3ª, 5ª e 7ª imunização) de cada cepa e foi considerado como branco, poços sem antígeno e sem amostra. Foi determinado, em etapa de padronização,

um *cut-off* de 0,2 de *optical density* (OD). Esse é o valor mínimo de detecção da ligação de IgY ao antígeno. Assim, para o cálculo da reatividade, foi obtido a concentração de proteína necessária para atingir este *cut-off* através de curvas de titulação de cada coleta e de cada cepa.

4.8 ANÁLISE DA AÇÃO DA IgY CONTRA OS MICRORGANISMOS *ACINETOBACTER* SPP. E *P. AERUGINOSA* MULTIRRESISTENTES

Esta técnica foi baseada no teste de Kelly e Matsen (1976), com adaptações. Inicialmente, as soluções de anticorpos IgY específicos foram ajustadas para a concentração de 30 mg/mL em meio MHBCA. Posteriormente, em uma microplaca de 96 poços 50 µl de MHBCA foram aplicados aos poços das colunas 2 a 12. Na coluna 1 foram adicionados 100 µL/poço da solução de IgY (30 mg/mL). A seguir, uma diluição seriada (1:2) foi realizada até a coluna 10. Os 50 µl restantes da diluição seriada foram adicionados aos poços da coluna do controle de esterilidade (coluna 12). Ao final 50 µL/poço da suspensão bacteriana (descrito no item 4.1) respectiva a cada IgY específica foram adicionados nas colunas de 1 a 10. Como controle do crescimento bacteriano 50 µl da suspensão bacteriana foram adicionados aos poços da coluna 11. As microplacas foram incubadas a 37°C ± 2°C por 24 horas, e a leitura foi feita ao final visualmente, avaliando o crescimento ou não de bactérias.

4.9 ANÁLISE DO SINERGISMO ENTRE IgY E BETA-LACTÂMICOS CONTRA OS MICRORGANISMOS *ACINETOBACTER* SPP. E *P. AERUGINOSA* MULTIRRESISTENTES

Esta técnica também foi baseada no protocolo de Kelly e Matsen (1976) modificado. Foram adicionados 100 µl do antimicrobiano (diluídos em MHBCA, no dia de uso) a 512 µg/mL para meropenem e imipenem e 2048 µg/mL para ceftazidima e realizada diluição seriada (1:2) da coluna 1 à coluna 11, nas linhas A-H, da esquerda para direita. Na linha A das colunas 1-11, foram adicionados 50 µl da solução contendo a IgY específica de cada microrganismo (concentração inicial de 30 mg/mL) e realizada a diluição seriada (1:2) da linha A para H (de cima para baixo). Em seguida, foram adicionados 50 µl do inóculo bacteriano (descrito no item 4.1) em todos os poços até a coluna 11. As concentrações finais nos poços

variam para os antimicrobianos de 128 a 0,0009785 $\mu\text{g/mL}$ (meropenem e imipenem) e de 512 a 0,00390625 $\mu\text{g/mL}$ (ceftazidima) e para a IgY de 7,5 a 0,058594 mg/mL.

Como controle negativo do antimicrobiano e da IgY, foram utilizados 50 μl remanescentes da última diluição seriada em 3 poços da coluna 12, F a H. O controle positivo compreendeu 50 μl do MHBCA e 50 μl da bactéria (A a E, coluna 12). Após o período de incubação de 24 horas (37°C) foi realizada leitura visual, detectando o crescimento bacteriano ou a ausência dele.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os resultados de ELISA, entre as coletas de cada cepa, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e o teste de Brow Forsythe para verificar a homogeneidade das variâncias. As variáveis paramétricas foram avaliadas pelo teste de ANOVA *one-way* com *post test* de Tukey e os dados foram expressos como média (\pm desvio-padrão). Diferença estatística foi considerado quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® versão 7.0.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido na revista “Microbes and Infection”, classificado como QUALIS B1 (Medicina II – quadriênio 2013-2016).

Synergistic effect between beta-lactams and IgY antibodies against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

Author's: Juliana Gutschow Gameiro^a; Leonardo Pinto Medeiros^b; Larissa dos Santos Fâvaro^a; Patrícia Canteri de Souza^b; Suelen Balero de Paula^a; Floristher Elaine Carrara Marroni^c; Emerson José Venancio^{d*}.

Affiliation:

^a: post-grad student in Clinical and Laboratory Pathophysiology. Department of health sciences of the State University of Londrina - UEL (Brazil).

^b: post-grad student in Microbiology. Department of biological sciences of the State University of Londrina - UEL (Brazil).

^c: Professor at the State University of Londrina - UEL (Brazil). Department of health sciences of the State University of Londrina - UEL (Brazil).

^d: Professor at the State University of Londrina - UEL (Brazil). Department of biological sciences of the State University of Londrina - UEL (Brazil).

Abstract

Introduction: Immunoglobulin Y (IgY) present in the egg yolk of birds has an important role in biotechnology and has been investigated for several microorganisms. We aimed to study the IgY interaction with beta-lactams for multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods:** Chickens were immunized for the *P. aeruginosa* (ATCC[®] 27853, KPC-2 and SPM-1) and *Acinetobacter baumannii* (ATCC[®] 19606, OXA-23, and OXA-253). The eggs were harvest at different periods and the IgY is extracted. Purity and the presence of specific antibodies were determined. Also bacterial MICs for meropenem, imipenem, and ceftazidime, MICs of the specifics IgY alone, and then in a combination of IgY plus beta-lactams. **Results:** Production of specific IgY after the third immunization. No MIC reduction with the specific IgY and the bacteria suspension alone was observed, however, for the OXA-23 and OXA-253 strains there was a reduction between four-fold and two-fold for the meropenem and ceftazidime MICs respectively. **Conclusion:** We obtained a reduction in MIC in the synergism test for meropenem of the OXA-23 and OXA-253 strains, while for ceftazidime only for the OXA-253 strain. The few options of treatment for resistant microorganisms open a new field of study of complementary therapy with specific IgY.

Keywords: beta-lactamase; oxacillinases; minimum inhibitory concentration; carbapenem; immunotherapy.

1. Introduction

Resistance in bacterial infections is a major concern to the survival and recovery of patients and the presence of infections related to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* are very common in hospital settings⁽¹⁾. The presence of carbapenem resistance among these two species is increasing and they already are considered as highly concerning pathogens^(2,3).

There are several subclasses of carbapenemase enzymes, but all degrade beta-lactams drugs, including carbapenem and cephalosporin's⁽⁴⁾. The *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) enzymes are more frequently reported in *Klebsiella* spp. yet its presence has been reported in *P. aeruginosa*^(5,6). Moreover, in Brazil is very common a variant of metallo-beta-lactamase, SPM-1⁽⁷⁾. For the *A. baumannii* are more common the presence of oxacilinases, being intrinsic to the species the OXA-51^(8,9). Among these enzymes are the OXA-23 and OXA-143 which are present all around the globe and responsive for the carbapenem resistance profiles^(3,10). Also, OXA-253 a variant of the OXA-143 has been related in Brazil since 2014^(3,11).

Harvest from the egg yolk of chickens, the IgY is an immunoglobulin similar to the human IgE and IgG⁽¹²⁾. Because of the facility to obtain and ethics related to the use of animals, it has been studied its use in immunodiagnosis, neutralization of venoms, and treatment of diseases^(13–15). There is success in the use of IgY as passive oral immunotherapy against *H. pylori*, reduced colonization of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients, and improvement of survival in induced pneumonia by *Acinetobacter baumannii* in a murine model^(16–18).

There is no study, to your knowledge, of a possible synergistic effect of specific IgY and antibiotics to treat bacterial infections. Therefore, we aimed in this study to produce and evaluate the *in vitro* activity of specific IgY with antibiotics (carbapenem and cephalosporin's) with their respective resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains.

2. Material and methods

2.1 Bacterial isolates

The isolates of *A. baumannii* *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-253}, *P. aeruginosa* *bla*_{SPM-1} and *bla*_{KPC-2} were donated from the laboratory of molecular studies and antimicrobial resistance of the State University of Londrina. Were previously identified, and the genes of resistance mentioned reconfirmed for this study. The ATCC® strains *A. baumannii* ATCC® 19606, *P. aeruginosa* ATCC® 27853, and *Escherichia coli* ATCC® 25922 were used as part of the study (ATCC® 19606 and ATCC® 27853) and/or as quality control in susceptibility testing assays (ATCC® 27853 and ATCC® 25922)⁽¹⁹⁾.

2.2 Species identification, susceptibility testing, and screening for resistance for carbapenem drugs

The detection of the resistance genes was through previously describe techniques, primers, and cycling conditions of polymerase chain reaction (PCR). The *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} were performed as the technique of Woodford *et al.* (2006)⁽²⁰⁾. For the gene *bla*_{OXA-253} (which is a *bla*_{OXA-143-LIKE}) was used a previous technique of our study group⁽³⁾. For *bla*_{SPM-1} the methodology of Mendes *et al.* (2007)⁽²¹⁾ and *bla*_{KPC-2} from Doyle *et al.* (2012)⁽²²⁾. All tests were performed with positive controls and negative controls and revealed in 0.8% agarose gel. Minimum inhibitory concentration (MIC) of isolates confirmed by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) agar dilution for ceftazidime, imipenem, and meropenem. *P. aeruginosa* ATCC® 27853 and *Escherichia coli* ATCC® 25922 strains used as quality control in susceptibility testing assays⁽²⁰⁾.

2.3 Immunization process and specific IgY production

This study used twelve chicken (*Gallus gallus domesticus*), two for each bacterial strain. The animals aged 20 weeks were donated from the farm school of the State University of Londrina and kept in individual cages at room temperature,

17 hours of light, water, and food *ad libitum* (laying hen diet, Purina, Brazil) during the experimental period. The animal ethical committee of the State University of Londrina (Paraná, Brazil) approved this study (n^o 5456.2019.94).

The bacterial strains of *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853, SPM-1, KPC-2; and of *A. baumannii* ATCC[®] 19606, OXA-23, and OXA-253 were inactivated by formaldehyde 1,5% and water bath at 68°C for 1 hour. Suffered a washing process with Phosphate Buffer Saline (PBS) (centrifugation 2650g, 10 minutes and removal of the supernatant and washed two times with PBS) and stored in -20°C in PBS/40% glycerol. The inactivation was confirmed by streaking of 10 µl of the final solution in CHROMagar[®].

In the days of immunization, the bacterial strains were washed again as before mentioned, however this time in saline 0.9%. The concentration of each, adjusted with saline 0.9% for the McFarland scale of 2.0 (equivalent to 6x10⁸ CFU/mL) with turbid meter DensiCHEK plus (bioMérieux, Durham, North Caroline), and applied intramuscular 500 µl per each chicken, divided into two areas of the breast (total applied of bacteria 3x10⁸ CFU/mL/animal). The immunization occurred in a total of 180 days divided into 7 immunization periods at days of 1, 15, 30 (3rd immunization), 45, 90 (5th immunization), 135, and 180 (7th immunization). The eggs were collected before the immunization (pre-immune) and one week after the 3rd, 5th, and 7th immunization, for 7 days⁽²³⁾.

2.4 IgY precipitation and purification

The IgY were obtained as previously described⁽²⁴⁾, through the ammonia sulfate precipitation process, with modifications^(25,26). The final product was diluted in PBS and was performed the protein quantification by the method of Bradford (1976)⁽²⁶⁾ and the purity test through SDS-PAGE 10% and stained with Coomassie blue⁽²⁷⁾.

2.5 Evaluation of the binding of specific IgY to its antigens by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The confirmation of specific IgY production was tested by ELISA. The antigen (100 µL/well) used were the bacterial strains, prepared similar to item 3 and

diluted for $6,25 \times 10^6$ CFU/mL in a carbonate-bicarbonate buffer (0,1M; pH 9,6). The antigen was applied in high binding plates and left overnight (4 ± 2 °C; wet chamber). Blocked for two hours with 100 μ L/well of PBS/skimmed milk 5% (37 ± 2 °C; wet chamber). Washed with 200 μ L/well of PBS, and incubated for one hour in the samples with the IgY (diluted in PBS/skimmed milk 1% at different concentrations). Again suffered three washing processes with 200 μ L/well PBS/tween 20 0.05%. The secondary antibody of anti-chicken IgY (100 μ L/well; whole molecule with peroxidase, 1:40000, produced in rabbit; ref. A9046 Sigma®) was incubated for one hour (37 ± 2 °C; wet chamber). For the revelation reaction, it was used 100 μ L/well of a combination of tetramethylbenzidine (TMBZ, 0,1mg/mL) and hydrogen peroxide (0,003%), diluted in citrate buffer (0.1 M; pH 5.0). The reaction time was 15 minutes for the *A. baumannii* and 20 minutes for *P. aeruginosa*. To stop the reaction was used 50 μ L/well of Sulphuric acid 2N and read at 450 nm. From the titration, a curve was obtained and founded the concentration necessary to obtain a signal of 0.2 Optical Density (OD) at the different collect moments of all strains.

2.6 Analysis of specific IgY with isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*

The following tests of items 2.6 and 2.7 were applied as proposed for Kelly and Matsen (1976) modified in a few points⁽²⁸⁾. First, all the IgY were adjusted to 30mg/mL with Muller Hilton Broth Cation Adjusted (MHBCA) and sterilized in a 0.22 μ m filter. In a microplate, 50 μ L/well of the MHBCA is applied to columns 2 to 12. To the first column was added 100 μ L/well of the IgY solutions. A following 1:2 dilution was done from the first column-to-column 10. The remaining solution, with the IgY diluted, was applied to the negative control (Column 12). Each bacteria suspension (Mc Farland 0.5, diluted 1:100; 50 μ L/well) was added to columns 1 to 11. The positive control, with only the media and the bacteria, were located in column 11. The plates were incubated at $37^\circ\text{C} \pm 2$ °C for 24 hours. The reading was visual, detecting growth, or not.

2.7 The synergic activity of specific IgY and bacterial isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*

The IgY were also adjusted to 30mg/mL with MHBCA and sterilized in a 0.22 μm filter. In a microplate, 50 μL /well of the MHBCA applied to all wells except for the well 1A. 100 μl of the antibiotic was applied to well 1A (512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Imipenem, 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ meropenem or 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ceftazidime) and a serial dilution of 1:2 done from column 1 to the 11, left to right, line A to H. To line A (column 1 to 11) was added 50 μL /well of the IgY solution (30mg/mL) and a 1:2 serial dilution done from lines A to H, up to bottom. 50 μl of bacteria solution (at Mc Farland 0.5 1:100) was added to the line A, column 1 to 11, and a serial dilution of 1:2 from up to bottom of these columns were done. As a negative control (column 12, line F to H), was used the last 50 μl of 3 wells of the final serial dilution of the IgY. Moreover, as a positive control was applied only the bacteria with media to the lines A to E, column 12. The plates were incubated at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 24 hours. The reading was visual, detecting growth, or not⁽²⁸⁾.

2.8 Statistical analysis

The ELISA analysis was performed in Graph Pad Prism[®] version 7.0. The values tested for normality and variance, using the test of Shapiro-Wilk and Brow Forsythe. The differences between groups were detected by ANOVA and the post-test of Tukey. The parametric dates are expressed as median \pm standard deviation. Was considered a statistical difference when the p-value of <0.05 .

3. Results

3.1 Resistance genes confirmation and susceptibility testing for resistance for carbapenem drugs

The genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-253}, *bla*_{OXA-51} were confirmed for their expected strains (Fig. 1). For the *P. aeruginosa* strains, the ATCC® 27853 did not present the *bla*_{KPC-2} (~1000 bp) and *bla*_{SPM-1} genes (~750 bp), and the other strains had their carbapenem-resistant genes confirmed. Besides, the internal control specific for the detection of *P. aeruginosa* species (~956 bp) was positive for the three strains (ATCC® 27853, SPM-1, and KPC-2). All *A. baumannii* presented the *bla*_{OXA-51} (~375 bp), also confirming the specie. The sensible strain ATCC® 19606 did not have the resistant genes of OXA-23 and OXA-253. The *bla*_{OXA-23} gene had a size of proximally of 500 bp and the *bla*_{OXA-253} a size of approximately 750 bp, being present on their expected strains. Furthermore, the susceptibility for the antibiotics is described in table 1. The ATCC®s and the OXA-253 were sensible for the ceftazidime and the rest resistant. All strains were resistant to meropenem and imipenem, except the ATCC® 19606 and 27853.

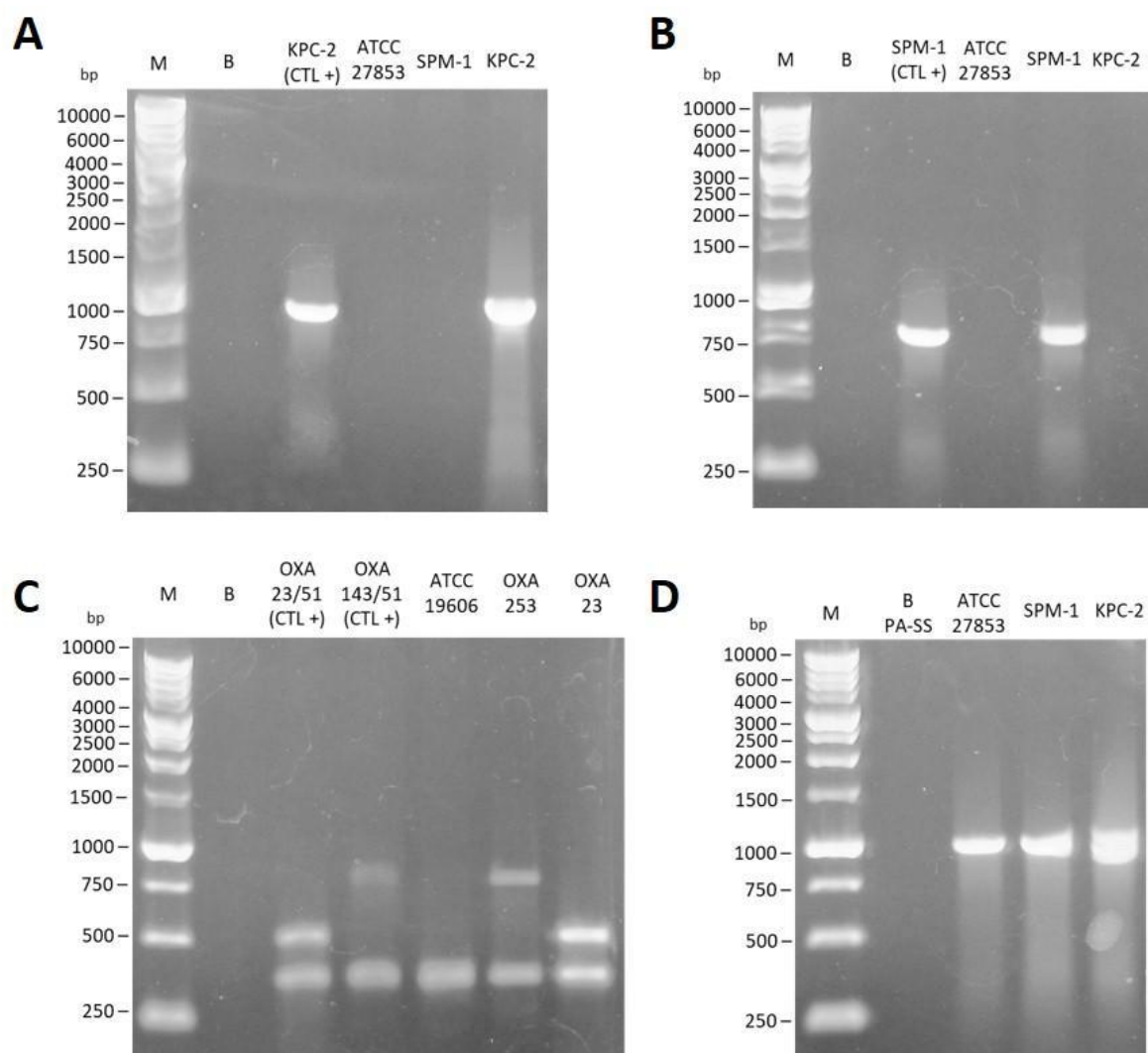


Fig. 1. PCR confirmation of the *Pseudomonas aeruginosa* strains genes bla_{KPC-2} and bla_{SPM-1} and for the genes bla_{OXA-23} , $bla_{OXA-253}$ (also called $bla_{OXA-143}$ -like), and bla_{OXA-51} for the *Acinetobacter baumannii* strains. bla_{KPC-2} (A) and bla_{SPM-1} (B) and for the genes bla_{OXA-23} (C), $bla_{OXA-253}$ (C, also called $bla_{OXA-143}$ -like), and bla_{OXA-51} (C) for the *Acinetobacter baumannii* strains, (D) Specie identification for the *P. aeruginosa* strains. M – Molecular weight marker; B – blank of the reaction; KPC-2 (CTL +) – positive control for the bla_{KPC-2} gene; SPM-1 (CTL +) – positive control for the bla_{SPM-1} gene; OXA 23/51 (CTL +) – positive control for the bla_{OXA-23} and bla_{OXA-51} genes; OXA 143/51 (CTL +) – positive control for the bla_{OXA-23} (or $bla_{OXA-143}$ -like) and bla_{OXA-51} genes; PA-SS – gene for identification of the *P. aeruginosa*. Source: the author JGG.

3.2 IgY purity and antigen binding

The IgY obtained through precipitation with ammonium sulfate was tested for purity with electrophoresis (Fig. 2). The process used involved the break of the heavy chain and the light chain (reducing conditions), shown for the proteins at approximately 65kDa and 25 kDa. In addition, an impurity protein is seen at the size of proximally 38 kDa.

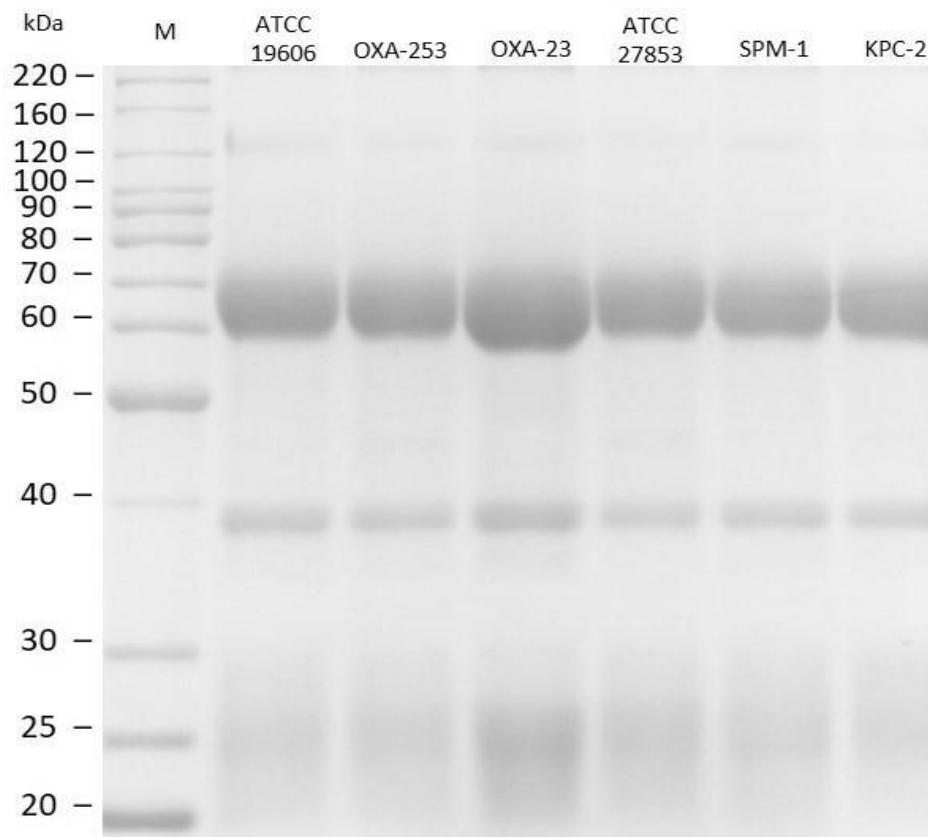


Fig. 2. SDS-PAGE of the different IgY extracted from the 7th immunization M – Molecular weight marker. The SDS-PAGE shows approximately 65 kDa and 25 kDa proteins. An impurity is observed in the size of approximately 38 kDa. Source: the author JGG.

We also analyzed by indirect ELISA the binding of the specific IgY with their antigens (whole bacteria) along the immunization period (Fig. 3) A decrease in the titles of antibodies necessary to achieve the cut-off through time, indicate the production of specific antibodies constantly increasing with the number of immunization. Knowing that we observed an increase of specific IgY since the third immunization ($p < 0.05$ compared to the pre-immune) for all strains, meaning an immune response to the injected bacteria. The ATCC[®] 19606, SPM-1, and OXA-253 had a similar result, producing and stabilizing the levels of specific antibodies since the third immunization. For the ATCC[®] 27853 and the KPC-2, the levels of specific IgY increased through the immunization process and stabilized in the fifth immunization. The OXA-23 had a different result, where the specific IgY titles increased over time and did not reach its peak and stabilized during the study time.

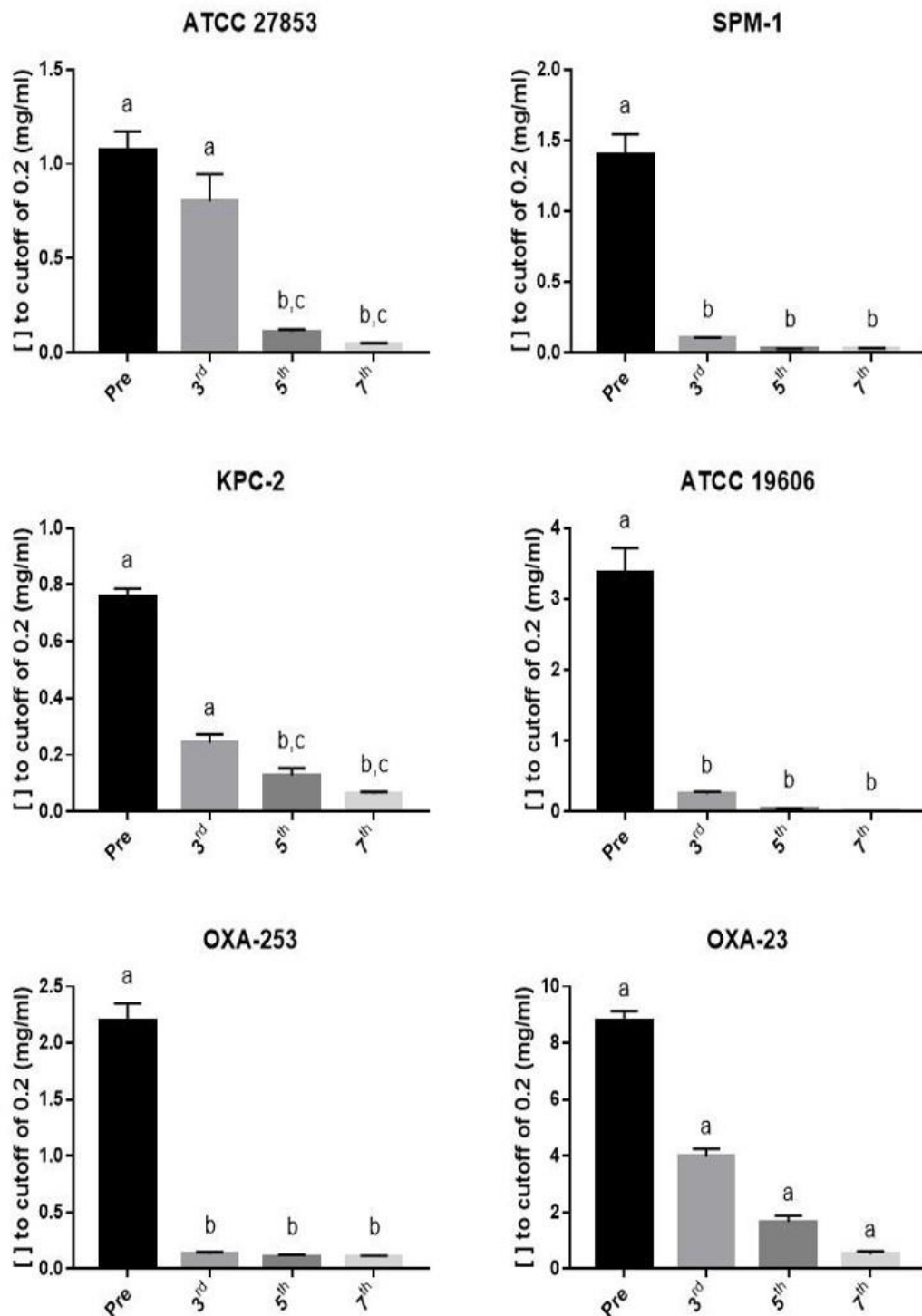


Fig. 3. Indirect ELISA of the specific IgY for the antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The values tested for normality and variance, and dates expressed as median \pm standard deviation. The differences between groups were detected by ANOVA and the post-test of Tukey. The statistical difference when the p-value of <0.05 . Abbreviations: Pre, pre immunization; 3rd, third immunization; 5th, fifth immunization; 7th, seventh immunization; a, $p < 0.05$ between all groups; b, $p < 0.05$ with pre immunization; c, $p < 0.05$ with 3^a immunization; d, $p < 0.05$ with 5^a immunization; e, $p < 0.05$ with 7^a immunization. Source: Graph Pad Prism® version 7.0.

3.3 Analysis of the specific IgY and the synergic activity of the specific IgY with the antibiotics with the *A. baumannii* and *P. aeruginosa*

The specific IgY of the different strains at a starting concentration of 15 mg/mL was not able to inhibit the growth of their respective bacteria antigen (Fig. 4). Therefore, we cannot calculate the synergism through the fractional inhibitory concentration (FIC) index, which uses the value of MIC for this test. Even the results of this previous test were not expected, we proceed to the evaluation of specific IgY and the carbapenem, imipenem, and ceftazidime to see if the combination would bring positive results.

The minimal inhibition concentration of all the combinations of imipenem and ceftazidime with specific IgY did not change for the strains ATCC[®] 19606, ATCC[®] 27853, SPM-1, and KPC-2. The OXA-253 had unchanged MIC for the imipenem, but for the ceftazidime, the MIC of 8 µg/mL lowered to 4 with the IgY concentration of 7.5 and 3.75 mg/mL. Also, the MIC of the meropenem reduced from 128 to 32 µg/mL when in the maximum concentration of IgY (7.5 mg/mL) and lowered to 64 µg/mL when 3.75 mg/mL of IgY. The OXA-23 had a reduction only for meropenem, lowering from 32 to 16 in the maximum concentration of 7.5 mg/mL of IgY. The ceftazidime and imipenem remained unchanged MIC for the OXA-23 strain.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the different strains of bacteria for the antibiotics ceftazidime, meropenem, and imipenem.

	Ceftazidime (µg/mL)	Meropenem (µg/mL)	Imipenem (µg/mL)
ATCC[®] 27853	≤1 ^S	≤0.25 ^S	0.5-0.25 ^S
SPM-1	≥512 ^R	≥128 ^R	≥128 ^R
KPC-2	256-128 ^R	≥128 ^R	≥128 ^R
ATCC[®] 19606	2.00 ^S	≤0.25 ^S	0.5-0.25 ^S
OXA-253	8 ^S	128 ^R	32 ^R
OXA-23	32 ^R	32 ^R	32 ^R

The interpretation of the MIC breakpoint values was from the CLSI (2020). S- sensible; I- intermediary; R- resistant. Values in µg/mL. Source: the author JGG.

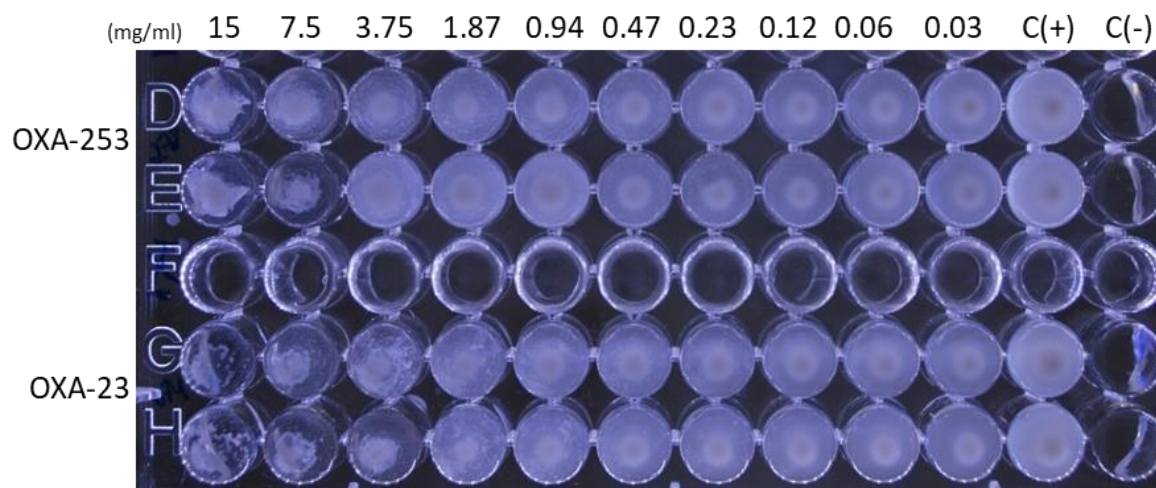


Fig. 4. Test of the specific IgY for the strains of *Acinetobacter baumannii* with the genes bla_{OXA-23} and bla_{OXA253} . At the upper the different concentrations of IgY (mg/mL) for each column and the identification of the positive control (C+) and negative control (C-). On the left, the identification of the strains (tested in duplicates). The photo was taken from the bottom of the microplate (U shape). Source: the own author.

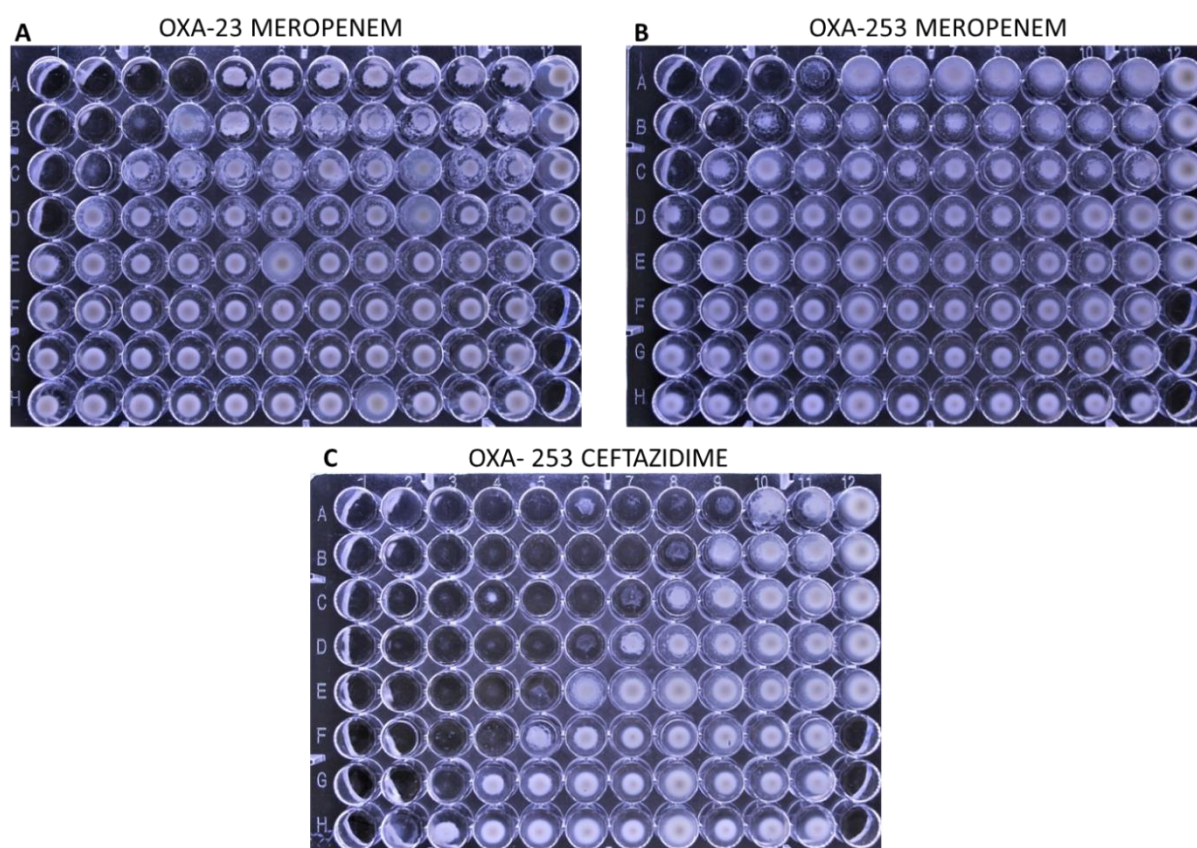


Fig. 5. Synergism test of the specific IgY with the antibacterial drug (meropenem and ceftazidime) and the bacteria strains of *Acinetobacter baumannii* with the genes bla_{OXA-23} and $bla_{OXA-253}$. A: specific IgY with meropenem and the *A. baumannii* bla_{OXA-23} strain. B: specific IgY with meropenem and the *A. baumannii* $bla_{OXA-273}$ strain. C: specific IgY with ceftazidime and the *A. baumannii* $bla_{OXA-253}$ strain. Positive controls at column 12, A to E lines, and negative controls at column 12, F to H lines. The photo was taken from the bottom of the microplate (U shape). Source: the author JGG.

4. Discussion

This is the first study to evaluate *in vitro* the synergism between carbapenem and IgY with resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. We successfully produced specific IgYs to all strains and obtained a MIC reduction with IgY with meropenem for the resistant strains OXA-23 and OXA-253, and also a two-fold reduction of the IgY with ceftazidime MIC for the OXA-253.

We successfully produced specific IgYs to all strains and obtained a MIC reduction with IgY and meropenem for the resistant strains OXA-23 and OXA-253, and a MIC reduction twice with IgY and ceftazidime for the OXA-253 strain.

The World Health Organization has listed in 2017 the *A. baumannii* and *P. aeruginosa* carbapenem-resistant as highly concerning pathogens⁽²⁹⁾. The resistance of these two bacteria is associated with inadequate antibiotic choice, indiscriminate use, sub-therapeutic and prolonged doses⁽³⁰⁾.

The advantages of IgY are the rapid and high quantities produced; reduction of animal suffering; no reaction with Fc receptors, rheumatoid factor, and complement proteins of humans⁽³¹⁾. Since the decade of 80, the functions and different potentials applications of the IgY are being studied for diagnosis, neutralization of venoms, and treatment of diseases^(13–15,32). Even being recommended its use by the European Centre for the Validation of Alternative Methods in 1996⁽³¹⁾.

In this study, we used clinical resistant strains to carbapenem and ATCC[®]s non-resistant. As determined by the CLSI (2020) MIC levels classification, all strains were considered resistant to the carbapenems, except for the ATCCs[®] ⁽²⁰⁾.

Aiming to minimize animal suffering, we tried a protocol of immunization with inactivated bacteria in saline. The most common protocol with animal intramuscular immunization uses Freud's adjuvant, aiming for a higher immune reaction to the antigen and consequently a successful production of immunoglobulin's. However, its use can cause several adverse effects such as local inflammation, granuloma formation, and ulcers⁽³³⁾.

We obtained the IgY from the egg yolk (proteins found at 65 kDa and 25 kDa), agreeing with another's authors for the heavy and low chain of the IgY under reducing conditions^(34–37). Also, we observed the presence of an impurity of 38

kDa, which could be an egg protein called phosvitin, as described by Jiang and Mine (2000)⁽³⁸⁾. Klimentzou *et al.* (2006) also described a protein of 35 kDa in the SDS-PAGE of their extracted IgY, but through a mass spectrometer, they identified it as a C-terminal fragment of vitellogenin II precursor, β -Livetin^(39, 40).

Knowing that the *A. baumannii* and the *P. aeruginosa* are disseminated in the environment^(41,42), it was expected some reaction with the pre-immune IgY in the ELISA test. However, we empathize that an immune response was seen to all antigens since the pre-immune samples had a statistical difference ($p < 0.05$) from the samples of the immunization process. Hence, we could observe that for the ATCC[®] 19606, SPM-1, and OXA-253 the levels of specific immunoglobulin rapidly increased since the 3rd immunization and maintained. For the ATCC[®] 27853 and KPC-2, the levels increased in the 3rd immunization and stabilized in the 5th and 7th immunization. Only the OXA-23 had an increase over time in the quantity of specific immunoglobulin, without stabilization during the experiment time.

In a normal immune response, the exposition of the host to the antigen through time leads to an increase in the production of antibodies^(25,40). Also, there is an increase in specificity and avidity of the immunoglobulin, depending on time and exposition level to the antigen^(25,42). Some explanations for the different responses to the antigens between the strains, in our study, are the use of more than one animal for each strain and variation of immunogenicity (since was used several animals, strains, and two different species of bacteria).

Nonetheless, we proved by the results of the ELISA tests a successful production of specific antibodies for their respective strains. We propose the use of the presented immunization protocol for further studies involving whole bacteria with a minimal time of 30 days and three administrations (with an interval of 15 days) depending on the avidity required (not measured in this study).

In the MIC test of the specific IgY and the bacteria alone, we did not see full inhibition of the growth, but visually it seems to reduce it on higher concentrations (fig. 4). Shi *et al.* (2017) reported a reduced growth of pan-drug resistant *A. baumannii*, with specific IgYs, but still did not completely inhibit from 5 to 20 mg/mL of specific IgY⁽¹⁷⁾.

However, in our study, we could not determine the growth reduction, because was observed agglutination at some IgY concentrations. It prevented a

reliable measure of the bacterial quantity and could lead to underestimating it. This phenomenon happened in the absence and presence of antibiotics (fig. 4 and 5).

Other studies also have seen agglutination reactions with IgY, agreeing with our findings. Shi *et al.* (2017), using scanning electron microscopy confirmed structural modifications, crenation, and enhanced agglutination of *A. baumannii* with specific IgYs⁽¹⁷⁾. Qin *et al.* (2018) see that the agglutination happened in a dose-dependent manner⁽⁴⁴⁾. A possibility to reduce the agglutination would be to reduce the number of bacteria added to the tests, but the entire test will need standardization and cannot be compared to the CLSI sensibility classification anymore⁽²⁰⁾.

It was observed that for the vast majority of strains there was no difference in the MICs, when in a combination of IgY and the antibiotics. The most interesting result of our work is that we had a reduction of two-fold for OXA-23 meropenem and four-fold for OXA-253 in the meropenem MIC. We also had a two-fold MIC reduction for ceftazidime, IgY, and the OXA-253. All reductions occurred at a concentration of 7.5 mg/mL of their specific IgY. However, we should note that even with a significant reduction, these strains have not changed their classification, as sensitive or resistant, when compared to their antibiotic MICs.

The absence of action in our results to the other strains and for imipenem could be attributed to the polyclonal feature of immunization antibodies. A study saw that for *P. aeruginosa*, most of the IgY are formed against flagellin, and when exposed to a mutant strain without it, did not kill it or increased the respiratory burst of polymorphonuclear neutrophils^(18,45). Therefore, depending on the quantities and the antibody's target, is possible to see a little or reduced reaction and consequently not inhibit the growth.

This study's limitations included the IgY concentration on the MIC tests and the agglutination. On the IgY MIC tests, the concentration was limited to 15 mg/mL and 7.5 mg/mL in the synergism test (our IgY storage was up to 35 mg/mL). To solve that problem on other further researches, we suggest that the IgY could be lyophilized, validated for function, and then diluted directly in the growth media for the tests⁽¹⁷⁾.

The IgY has demonstrated several immune functions in the literature, such as agglutination, opsonization, neutralization and induced increased respiratory burst of polymorphonuclear neutrophils and reduced adherence of bacteria^(45,46).

Although, these studies demonstrated these protective effects *in vivo*, and other immune components are related to the IgY functions. For further investigations, we also suggest the evaluation of the specific IgY performance *in vivo*.

5. Conclusion

In this study, we produced specific IgY against *P. aeruginosa* and *A. baumannii* and observed reduced growth with its use. However, only the resistant *A. baumannii* strains had reduced meropenem MICs in combination with the specific IgY. To your knowledge, we are the first to evaluate *in vitro* the synergism between carbapenem and specific IgY with resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. The application of IgY in the fight to resistant infections is a prospective field area since treatment options are scarce, and not only *P. aeruginosa* and *A. baumannii* develop several mechanisms of resistance and the use of specific IgY could be an ally in this fight. Yet, the applications of this IgY with *in vivo* studies are necessary to determine their real benefits.

6. Acknowledgments

We thank Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni (the sixth affiliated) for providing the bacterial strains and technical guidance. We also thank the Graduation Program of Clinical and Laboratory Physiopathology of the State University of Londrina (Brazil, PR) and the Outpatient Clinic of the University Hospital of Londrina (Brazil, PR). This research did not receive any funding from public agencies or other public organizations.

7. Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

8. References

1. Bickenbach J, Schöneis D, Marx G, Marx N, Lemmen S, Dreher M. Impact of multidrug-resistant bacteria on outcome in patients with prolonged weaning. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2018 Dec 20;18(1):141. Available from: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-018-0708-3><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30126392>
2. Federico MP, Furtado GH. Immediate and later impacts of antimicrobial consumption on carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp. in a teaching hospital in Brazil: a 10-year trend study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018 Nov 15;37(11):2153–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-018-3352-1>
3. Romanin P, Palermo RL, Cavalini JF, Fávaro LDS, De Paula-Petroli SB, Fernandes EV, *et al.* Multidrug- and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: The importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2019 Nov 1;25(9):1365–73. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2019.0002>
4. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* [Internet]. 2019 Aug;431(18):3472–500. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283619301822>
5. Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. Kluytmans J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Mar 11;8(3):e59015. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059015>
6. Carrara-Marroni FE, Cayô R, Streling AP, da Silva ACR, Palermo RL, Romanin P, *et al.* Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2015 Dec;3(4):304–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716515000703>
7. Gales, Ana C.; Menezes, Liana C.; Silbert, Suzane; Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2003 Sep 1;52(4):699–702. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkg416>
8. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2015 Dec 12;5(1):21. Available

from: <http://www.annalsofintensivecare.com/content/5/1/21>

9. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974–6.
10. Chakravarty B. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in *Acinetobacter baumannii*: background, challenges, and future prospects. *Mol Biol Rep [Internet]*. 2020 May 17;47(5):4037–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05389-4>
11. Girlich D, Damaceno QS, Oliveira AC, Nordmann P. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class d β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2976–8.
12. Taylor AI, Gould HJ, Sutton BJ, Calvert RA. Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. *J Biol Chem [Internet]*. 2008 Jun 13;283(24):16384–90. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M801321200>
13. Thirumalai D, Visaga Ambi S, Vieira-Pires RS, Xiaoying Z, Sekaran S, Krishnan U. Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *Int J Biol Macromol [Internet]*. 2019 Sep;136:755–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>
14. Leiva CL, Gallardo MJ, Casanova N, Terzolo H, Chacana P. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. *Int Immunopharmacol [Internet]*. 2020 Apr;81(October 2019):106269. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106269>
15. Lanzarini NM, Bentes GA, Volotão E de M, Pinto MA. Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. *J Immunoassay Immunochem [Internet]*. 2018 May 4;39(3):235–48. Available from: <https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1500375>
16. Solhi R, Alebouyeh M, Khafri A, Rezaeifard M, Aminian M. In vitro evaluation of cross-strain inhibitory effects of IgY polyclonal antibody against *H. pylori*. *Microb Pathog [Internet]*. 2017 Sep;110:682–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.025>
17. Shi H, Zhu J, Zou B, Shi L, Du L, Long Y, *et al*. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomed Pharmacother [Internet]*. 2017 Nov 12;95(1):1734–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29549232>
18. Nilsson E, Amini A, Wretling B, Larsson A. *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Chromatogr B [Internet]*. 2007 Sep;856(1–2):75–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002320700390X>
19. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

20. Woodford N, Ellington M, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2006 Apr;27(4):351–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857906000264>
21. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2007 Feb 1;45(2):544–7. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01728-06>
22. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 Dec 1;50(12):3877–80. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02117-12>
23. de Andrade FG, Eto SF, Navarro dos Santos Ferraro AC, Gonzales Marioto DT, Vieira NJ, Cheirubim AP, *et al.* The production and characterization of anti-bovotropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. *Toxicon* [Internet]. 2013 May;66:18–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.018>
24. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from Egg Yolk : Isolation and Purification. *J Food Sci.* 1992;57(3):629–34.
25. da Silva MC, Schaefer R, Gava D, Souza CK, da Silva Vaz I, Bastos AP, *et al.* Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. *J Immunol Methods* [Internet]. 2018 Oct;461(April):100–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.06.023>
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May;72(1–2):248–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 Aug;227(5259):680–5. Available from: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chng-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
28. Kelly MT, Matsen JM. In vitro activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1976 Mar 1;9(3):440–7. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.9.3.440>
29. World health organization (WHO). 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL_Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>.
30. Bickenbach J, Schöneis D, Marx G, Marx N, Lemmen S, Dreher M. Impact of multidrug-resistant bacteria on outcome in patients with prolonged weaning. *BMC*

Pulm Med [Internet]. 2018 Dec 20;18(1):141. Available from: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-018-0708-3>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30126392>

31. Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. Vol. 24, ATLA Alternatives to Laboratory Animals. 1996. p. 925–34.

32. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2019 Aug;73(January):293–303. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919302206>

33. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2001;70(6):849–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739546>

34. Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *J Genet Eng Biotechnol* [Internet]. 2018 Jun;16(1):99–103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>

35. Yang D, Mai K, Zhou Q, Zhu Y, Xing J, Luo C, *et al.* The protective efficacy of specific egg yolk immunoglobulin Y (IgY) against *Riemerella Anatispestifer* infections. *Vet Microbiol* [Internet]. 2020 Apr;243(March):108642. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811351931140X>

36. Mwale PF, Lee C-H, Lin L-T, Leu S-J, Huang Y-J, Chiang L-C, *et al.* Expression, purification, and characterization of anti-zika virus envelope protein: polyclonal and chicken-derived single chain variable fragment antibodies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jan 13;21(2):492. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/492>

37. Carrara GMP, Silva GB, Faria LS, Nunes DS, Ribeiro VS, Lopes CA, *et al.* IgY antibody and human neurocysticercosis: a novel approach on immunodiagnosis using *Taenia crassiceps* hydrophobic antigens. *Parasitology* [Internet]. 2020 Feb 23;147(2):240–7. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182019001446/type/journal_article

38. Jiang B, Mine Y. Preparation of Novel Functional Oligophosphopeptides from Hen Egg Yolk Phosvitin. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2000 Apr;48(4):990–4. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf990600I>

39. Mine, Yoshinori. *Egg Bioscience and biotechnology*. 1. ed. United States of America: John Wiley & Sons, 2008. p. 1-3629

40. Klimentzou P, Paravatou-Petsotas M, Zikos C, Beck A, Skopeliti M, Czarnecki J, *et al.* Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides* [Internet]. 2006 Jan;27(1):183–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978105003207>

41. Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, *et al.* The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*. 2020;128(3):220–31.
42. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou M-L. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2013 Oct;17(10):e802–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971213001562>
43. Svendsen Bollen L, Crowley A, Stodulski G, Hau J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J Immunol Methods* [Internet]. 1996 Jan;191(2):113–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175996000105>
44. Qin Z, Babu VS, Li N, Fu T, Li J, Yi L, *et al.* Protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2018 Jul;78:26–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.001>
45. Thomsen K, Christophersen L, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Moser C, Høiby N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2016 Feb 22;12(7):1–10. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2016.1145848>
46. Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Høiby N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies induce specific bacterial aggregation and internalization in human polymorphonuclear neutrophils. McCormick BA, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2015 Jul;83(7):2686–93. Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02970-14>

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, conseguimos produzir IgY específicas contra cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* não resistentes e resistentes a carbapenêmicos. Apesar de não conseguirmos um valor de MIC para a ação isolada da IgY e suas respectivas bactérias, observamos um crescimento reduzido. Na avaliação da interação entre IgY específicas e o meropenem, vimos um valor reduzido de CIM apenas para algumas das cepas de *A. baumannii* resistentes. As limitações deste trabalho incluem: reações de aglutinação e concentração restrita de IgY nos testes de CIM.

A aplicação de IgY no combate a infecções resistentes é uma área de campo promissora visto que as opções de tratamento são escassas, e não apenas *P. aeruginosa* e *A. baumannii* desenvolvem diversos mecanismos de resistência e o uso de IgY específico pode ser um aliado nessa luta. Dentro de nosso conhecimento, fomos o primeiro trabalho a avaliar *in vitro* a interação de carbapenêmicos e IgY específicas com *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes. Sugerimos no futuro, a aplicação de IgY específicas contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii* em estudos *in vivo*, para determinar seus benefícios na aplicação prática.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): SEGURANÇA DO PACIENTE. **Boletim Informativo: Avaliação dos Indicadores Estaduais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, Resistência Microbiana e Consumo de Antimicrobianos no Paraná, notificados no Sistema Online de Notificação de Infecções Hospitalares (SONIH) de janeiro a junho de 2018.**

Disponível em:

<<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-3>>. Acesso em: 22 set. 2020b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): SEGURANÇA DO PACIENTE. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM, 2018.** Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-20-incidentes-relacionados-a-assistencia-a-saude-2018>>. Acesso em: 22 abr. 2020a.

DE ANDRADE, F. G.; ETO, S. F.; NAVARRO DOS SANTOS FERRARO, A. C.; *et al.* The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, v. 66, p. 18–24, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.018>>. .

ANTONIO, C. S.; NEVES, P. R.; MEDEIROS, M.; *et al.* High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1322–1323, 2011. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/55/3/1322>>. .

AKBARI, M. R.; AHMADI, A.; MIRKALANTARI, S.; SALIMIAN, J. Anti-*Vibrio cholerae* IgY antibody inhibits mortality in suckling mice model. **Journal of the National Medical Association**, v. 110, n. 1, p. 84–87, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnma.2017.04.001>>. .

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and purification. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 629–634, 1992.

BARATI, B.; EBRAHIMI, F.; NAZARIAN, S. Production of chicken egg yolk antibody (IgY) against recombinant cholera toxin b subunit and evaluation of its prophylaxis potency in mice. **Iranian journal of immunology (IJI)**, v. 15, n. 1, p. 47–58, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29549232>>. .

BAYAT, M.; KHABIRI, A.; HEMATI, B. Corrigendum to “Development of IgY-based sandwich elisa as a robust tool for rapid detection and discrimination of toxigenic *Vibrio cholera*”. Canadian Journal of **Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, p. 1–1, 2019. Hindawi. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/cjidmm/2019/4164982/>>. .

BICKENBACH, J.; SCHÖNEIS, D.; MARX, G.; *et al.* Impact of multidrug-resistant bacteria on outcome in patients with prolonged weaning. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 18, n. 1, p. 141, 2018. **BMC Pulmonary Medicine**. Disponível em:

<<https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-018-0708-3>>
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30126392>>. .

BORGES, I. P.; SILVA, M. F.; SANTIAGO, F. M.; *et al.* Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 333–342, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178>>. .

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>>. .

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295–306, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>>. .

CARRARA-MARRONI, F. E.; CAYÔ, R.; STRELING, A. P.; *et al.* Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 4, p. 304–306, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716515000703>>. .

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2020.

CONLAN, S.; THOMAS, P. J.; DEMING, C.; *et al.* Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 254, p. 254ra126-254ra126, 2014. Disponível em: <<https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.300984>>. .

COHEN, Jonathan; POWDERLY, William G.; OPAL, Steven M.. **Infectious Diseases**. 4. ed. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 1579-1599.

CRONE, S.; VIVES-FLÓREZ, M.; KVICH, L.; *et al.* The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Apmis**, v. 128, n. 3, p. 220–231, 2020.

DONALD, H. M.; SCAIFE, W.; AMYES, S. G. B.; YOUNG, H.-K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -Lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 196–199, 2000. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/44/1/196>>. .

DOYLE, D.; PEIRANO, G.; LASCOLS, C.; *et al.* Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, 2012. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02117-12>>. .

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; *et al.* Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, n. January, p. 153–160, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.048>>. .

EVEILLARD, M.; KEMPF, M.; BELMONTE, O.; PAILHORIÈS, H.; JOLY-GUILLOU, M.-L. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. e802–e805, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971213001562>>. .

DE FARIA, L. S.; DE SOUZA, D. L. N.; RIBEIRO, R. P.; *et al.* Highly specific and sensitive anti-*Strongyloides venezuelensis* IgY antibodies applied to the human strongyloidiasis immunodiagnosis. **Parasitology International**, v. 72, n. August 2018, p. 101933, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101933>>. .

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 226–36, 1980.

GALES, ANA C.; MENEZES, LIANA C.; SILBERT, SUZANE; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699–702, 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkg416>>. .

GUIROR, A. K.; WRIGHT, G. D. Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections. *Chest*, v. 154, n. 5, p. 1202–1212, 2018. **Elsevier Inc.** Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.06.019>>. .

HATAMZADE ISFAHANI, N.; RAHIMI, S.; RASAEI, M. J.; *et al.* The effect of capsulated and noncapsulated egg-yolk-specific antibody to reduce colonization in the intestine of *Salmonella enterica* spp. enterica serovar Infantis-challenged broiler chickens. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1387–1394, 2020. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.019>>. .

HIGGINS, P. G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 305, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857909004890>>. .

KELLY, M. T.; MATSEN, J. M. In Vitro activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 9, n. 3, p. 440–447, 1976. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.9.3.440>>. .

KOPOTSA, K.; OSEI SEKYERE, J.; MBELLE, N. M. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae : a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1457, n. 1, p. 61–91, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nyas.14223>>. .

LABARCA, J. A.; SALLES, M. J. C.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 1–17, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2014.940494>>..

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chng-e-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>>. .

LEE, W.; SYED ATIF, A.; TAN, S. C.; LEOW, C. H. 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. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.001>>. .

LEIVA, C. L.; CANGELOSI, A.; MARICONDA, V.; *et al.* IgY-based antivenom against *Bothrops alternatus*: Production and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 163, n. March, p. 84–92, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010119300972>>. .

LEIVA, C. L.; GALLARDO, M. J.; CASANOVA, N.; TERZOLO, H.; CHACANA, P. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. **International Immunopharmacology**, v. 81, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106269>>. .

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34–44, 2019. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2018-0275>>. .

LIU, J.; HE, Q.; WANG, W.; *et al.* Preparation and neutralization efficacy of IgY antibodies raised against *Deinagkistrodon acutus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 22, 2017. Disponível em: <<http://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-017-0112-0>>. .

MA, H.; O'KENNEDY, R. The structure of natural and recombinant antibodies. In: G. Hounen (Org.); , **Methods in Molecular Biology**. v. 1348, p.7–11, 2015. New York, NY: Springer New York. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2999-3>>. .

MATHERS, A. J.; COX, H. L.; KITCHEL, B.; *et al.* Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **(K. Bush, Org.)mBio**, v. 2, n. 6, p. e00204, 2011. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/content/2/6/e00204-11>>. .

MENDES, R. E.; KIYOTA, K. A.; MONTEIRO, J.; *et al.* Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544–547, 2007. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01728-06>>. .

MOSTACHIO, A. K.; LEVIN, A. S.; RIZEK, C.; *et al.* High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 5, p. 396–401, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.021>>. .

MWALE, P. F.; LEE, C.-H.; LIN, L.-T.; *et al.* Expression, purification, and characterization of anti-zika virus envelope protein: polyclonal and chicken-derived single chain variable fragment antibodies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 492, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/492>>. .

NGUYEN, S. V.; NGUYEN, M. T. H.; TRAN, B. C.; *et al.* Evaluation of lozenges containing egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains as an adjunct to conventional non-surgical therapy in periodontitis patients: A randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. 11, p. 1334–1339, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/JPER.18-0037>>. .

NILSSON, E.; AMINI, A.; WRETLIND, B.; LARSSON, A. *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. **Journal of Chromatography B**, v. 856, n. 1–2, p. 75–80, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002320700390X>>. .

NILSSON, E.; LARSSON, A.; OLESEN, H. V.; WEJÅKER, P.-E.; KOLLBERG, H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**, v. 43, n. 9, p. 892–899, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.20875>>. .

PEREIRA, E. P. V.; VAN TILBURG, M. F.; FLOREAN, E. O. P. T.; GUEDES, M. I. F. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**, v. 73, n. January, p. 293–303, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919302206>>. .

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 568–585, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>>. .

QIAO, W.; WANG, F.; XU, X.; *et al.* Egg yolk immunoglobulin interactions with *Porphyromonas gingivalis* to impact periodontal inflammation and halitosis. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 176, 2018. **Springer Berlin Heidelberg**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0706-0>>.

RANJBAR, M.; BEHROUZ, B.; NOROUZI, F.; MOUSAVI GARGARI, S. L. Anti-PcrV IgY antibodies protect against *Pseudomonas aeruginosa* infection in both acute pneumonia and burn wound models. **Molecular Immunology**, v. 116, n. February, p. 98–105, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.10.005>>. .

DA ROCHA, D. G.; FERNANDEZ, J. H.; DE ALMEIDA, C. M. C.; *et al.* Development of IgY antibodies against anti-snake toxins endowed with highly lethal neutralizing activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. April, p. 404–412, 2017. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.069>>. .

ROMANIN, P.; PALERMO, R. L.; CAVALINI, J. F.; *et al.* Multidrug- and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: The Importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 9, p. 1365–1373, 2019. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2019.0002>>. .

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.-L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 21, 2015. Springer Paris. Disponível em: <<http://www.annalsofintensivecare.com/content/5/1/21>>. .

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>>. .

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, 1996.

SHI, H.; ZHU, J.; ZOU, B.; *et al.* Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, n. September, p. 1734–1742, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217300847>>. .

SHIN, J.-H.; YANG, M.; NAM, S. W.; *et al.* Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of Helicobacter pylori Infection. **CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY**, v. 9, n. 5, p. 1061–1066, 2002. Disponível em: <<https://cvi.asm.org/content/9/5/1061>>. .

SIFI, A.; ADI-BESSALEM, S.; LARABA-DJEBARI, F. Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. **International Immunopharmacology**, v. 61, n. June, p. 256–265, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576918302649>>. .

DA SILVA, M. C.; SCHAEFER, R.; GAVA, D.; *et al.* Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. **Journal of Immunological Methods**, v. 461, n. April, p. 100–105, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.06.023>>. .

SOLHI, R.; ALEBOUYEH, M.; KHAFRI, A.; REZAEIFARD, M.; AMINIAN, M. In vitro evaluation of cross-strain inhibitory effects of IgY polyclonal antibody against *H. pylori*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 682–687, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.025>>. .

SOMASUNDARAM, R.; CHORARIA, A.; ANTONYSAMY, M. An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review. **International Immunopharmacology**, v. 85, n. January, p. 106654, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576920315010>>. .

SOUMAILA GARBA, A.; THIBODEAU, A.; PERRON, A.; *et al.* In vitro efficacy of potentiated egg yolk powder against *Campylobacter jejuni* does not correlate with *in vitro* efficacy. (**J. E. Wells, Org.**)**PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0212946, 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0215699>>. .

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. PCR-Based Assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* Species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074–2079, 2004.

SUDJARWO, S. A.; ERAIKO, K.; SUDJARWO, G. W.; KOERNIASARI. The potency of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) specific as immunotherapy to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 8, n. 3, p. 91–96, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28516060>>. .

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 2, p. 120–32, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25836957>>. .

TAYLOR, A. I.; FABIANE, S. M.; SUTTON, B. J.; CALVERT, R. A. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. **Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 558–562, 2009. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi8019993>>. .

TAYLOR, A. I.; GOULD, H. J.; SUTTON, B. J.; CALVERT, R. A. avian igy binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16384–16390, 2008. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M801321200>>. .

TAYLOR, A. I.; SUTTON, B. J.; CALVERT, R. A. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 2, p. 97–101, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X0900189X>>. .

TESHAGER, D.; TESFAYE, S.; FIKRE, Z.; MU UZ, G.; YIMER, M. The potential application of avian egg antibodies with emphasis on immunotherapeutic and immunodiagnostic purpose. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 7, n. 5, p. 145–158, 2015. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/JVMAH/article-abstract/2EB008E52225>>. .

TIZARD, Ian R.. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier, 2014. p. 1-568.

THIBODEAU, A.; FRAVALO, P.; PERRON, A.; LEWANDOWSKI, S. L. Production and characterization of anti-*Campylobacter jejuni* IgY derived from egg yolks. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 1–9, 2017. BioMed Central. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13028-017-0346-4>>. .

THOMSEN, K.; CHRISTOPHERSEN, L.; JENSEN, P. Ø.; *et al.* Anti- *Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils. Human **Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 7, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2016.1145848>>. .

TOFTELAND, S.; NASEER, U.; LISLEVAND, J. H.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, Ø. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. (**J. Kluytmans, Org.**)**PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59015, 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059015>>. .

TOLEMAN, M. A. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673–679, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkf210>>. .

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; *et al.* β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019. The Authors. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283619301822>>. .

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TURTON, J. F.; WOODFORD, N.; GLOVER, J.; *et al.* Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2974–2976, 2006.

VANEECHOUTTE, MARIO; DIJKSHOORN, LENIE; TJERNBERG, INGELA; ELAICHOUNI, ABDESLAM; DE VOS, PAUL DE; CLAEYS, GEERT; VERSCHRAEGEN, G. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 11–15, 1995.

WANG, F.; QIAO, W.; BAO, B.; *et al.* effect of igy on periodontitis and halitosis induced by *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 311–320, 2019a. Disponível em: <<http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1810.10044>>. .

WANG, F.; QIAO, W.; XU, X.; *et al.* Egg yolk immunoglobulins' impact on experimental periodontitis caused by *Porphyromonas gingivalis*. **Technology and Health Care**, v. 26, n. 5, p. 805–814, 2018. Disponível em:

<<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/THC-181255>>. .

WANG, X.; SONG, L.; TAN, W.; ZHAO, W. Clinical efficacy of oral immunoglobulin Y in infant *Rotavirus enteritis*. **Medicine**, v. 98, n. 27, p. e16100, 2019b. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00005792-201907050-00025>>.

WERNECK, J. S.; PICÃO, R. C.; GIRARDELLO, R.; *et al.* Low prevalence of *bla*_{OXA-143} in private hospitals in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4494–4495, 2011. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/55/9/4494>>. .

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.; COELHO, J.; *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 351–353, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857906000264>>. .

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2017. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL_Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>. Acesso em: 29 set. 2020.

ZHANG, X.; CALVERT, R. A.; SUTTON, B. J.; DORÉ, K. A. IgY: a key isotype in antibody evolution. **Biological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 2144–2156, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12325>>. .

ZHANG, X.; LI, F.; CUI, S.; *et al.* Prevalence and distribution characteristics of *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} Genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 2901–2910, 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/prevalence-and-distribution-characteristics-of-blakpc-2-and-blandm-1-g-peer-reviewed-article-IDR>>. .