



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA CAROLINA NAVARRO DOS SANTOS FERRARO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE  
ANTICORPOS IgY CONTRA BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS**

---

Londrina  
2019

ANA CAROLINA NAVARRO DOS SANTOS FERRARO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE  
ANTICORPOS IgY CONTRA BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina  
2019

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

AN532 Ferraro, Ana Carolina Navarro dos Santos.  
Análise da atividade antimicrobiana in vitro de anticorpos IgY contra bactérias multiresistentes aos antimicrobianos / Ana Carolina Navarro dos Santos Ferraro. - Londrina, 2019.  
55 f. : il.

Orientador: Emerson Jose Venancio.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2019.  
Inclui bibliografia.

1. A. Baumannii - Tese. 2. P. Aeruginosa - Tese. 3. Resistência bacteriana - Tese. 4. Imunoterapia - Tese. I. Venancio, Emerson Jose. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

CDU 616

ANA CAROLINA NAVARRO DOS SANTOS FERRARO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE  
ANTICORPOS IgY CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES  
AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Floristher Elaine Carrara Marroni  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de outubro de 2019

Dedico este trabalho aos meus pais João Luiz e Sandra, que não mediram esforços para que essa conquista se tornasse possível. Aos meus avós Orlando e Isabel, minha irmã Maria Eduarda, minha prima Flávia e meu noivo Danilo, por todo apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força e amor.

À minha família por todo apoio, carinho e estímulo. Em especial aos meus pais e meus avós pelo incentivo, por dar todo o suporte para que eu concluísse mais essa etapa. A minha irmã, minhas primas e tias por toda ajuda e dedicação. Ao meu noivo por todo carinho, compreensão e paciência.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Emerson José Venancio pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, por toda orientação, paciência e pelos ensinamentos.

A Professora Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni por todo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, por ter disponibilizado o laboratório de Microbiologia para execução dos experimentos e pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Gerson Nagazato, componente da banca de qualificação pelas correções e valiosas sugestões. A professora Eiko Nakagawa Itano por aceitar participar da banca de defesa do mestrado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos do laboratório de imunologia IV por toda auxílio, amizade e carinho. Em especial a Professora Dr<sup>a</sup> Carla Cristiane da Silva, Denise Turini Gonçalves Marioto, Miriele Carolina da Silva, Aline Miquelin, Franciele Eleodoro, Eduardo Vignoto Fernandes, Michele Pagliari Oliveira, Márcio Scarone, Ana Paula Cheirubim, Luciana Shiga e Suelen Balero de Paula que me auxiliaram com os experimentos no laboratório dispondo-se do seu tempo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada.

FERRARO, Ana Carolina Navarro dos Santos. **Análise da atividade antimicrobiana *in vitro* de anticorpos IgY contra bactérias multirresistentes aos antimicrobianos**. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2019.

## RESUMO

*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são responsáveis por infecções hospitalares de difícil tratamento em razão da emergência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos. IgY, um anticorpo produzido nas aves, tem sido utilizado em estudos de imunoterapia de doenças por possuir vantagens, como a facilidade na sua produção e purificação. O objetivo desse trabalho foi produzir anticorpos IgY específicos para cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistente e determinar sua atividade antimicrobiana *in vitro*. Galinhas poedeiras (White Leghorns) foram imunizadas via intramuscular nos dias 14, 28, e 42 e receberam 4 doses reforços a cada 42 dias com 2 cepas de *P. aeruginosa* e uma de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases e portadoras dos genes de resistência aos beta-lactâmicos *blaspm-1*, *blavim-2* e *bla<sub>OXA-23</sub>* respectivamente. Foram realizadas coletas de sangue e ovo. As técnicas de ELISA e *western blotting* foram realizadas para caracterização imunoquímica dos anticorpos IgY. A ação antimicrobiana dos anticorpos IgY foi avaliada por incubação das cepas bacterianas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* a  $1 \times 10^6$  UFC/mL com anticorpos IgY específicos e inespecíficos na concentração de 5 a 0,156 mg/ml. Os resultados obtidos mostraram que há um aumento nos níveis de anticorpos IgY específicos no soro dos animais a partir da primeira imunização. Os anticorpos IgY extraídos da gema reconhecem os antígenos bacterianos. Além disso, IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, promoveu a inibição do crescimento *in vitro* de *A. baumannii* *bla<sub>OXA-23</sub>* e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1. Enquanto os anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* das cepas de *P. aeruginosa* *blaspm-1* e *blavim-2*, respectivamente. Em ambos os casos a inibição ocorreu de maneira dose dependente. Nossos resultados sugerem que a imunoterapia com IgY possa ser uma alternativa utilizada no tratamento de infecções por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** *A. Baumannii*. *P. Aeruginosa*. Resistência bacteriana. Imunoterapia. Aves.

FERRARO, Ana Carolina Navarro dos Santos. **Analysys of antimicrobial activity in vitro of antibodies IgY against multidrug resistant bacteria**. 2019. 55 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2019.

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* are responsible for nosocomial infections which are difficult to treat due to the emergence of strains multiresistant to antimicrobials. IgY, an antibody produced in poultry, has been used in studies of the immunotherapy of diseases as it possesses advantages such as the easiness of production and purification. The objective of this work was to produce specific IgY antibodies to the multiresistant *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains and determine its antimicrobial activity in vitro. Laying hens (White Leghorns) were immunized intramuscularly on days 14, 28, and 42 and received 4 boosters every 42 days with an inoculum of carbapenemase producing *A. baumannii* and *P. aeruginosa* and carriers of genes conferring resistance to  $\beta$ -lactam bla oxa-23, bla spm-1, and bla vim-2, respectively. Blood and egg samples were taken. ELISA technique and western blotting were performed to immunochemical characterization of IgY antibodies. Bacterial strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* at a concentration of  $1 \times 10^6$  UFC/mL were incubated with specific and non-specific IgY antibodies in MHB at the concentration of 5 to 0.156 mg/ml. There was an increase in the levels of specific IgY antibodies in the serum of animals since the first immunization. Specific IgY extracted from the yolk showed an intense recognition of bacterial antigens. Added to that, it was observed that IgY anti-OXA-23-producing *A. baumannii*, IgY anti-SPM-1-producing *P. aeruginosa* and IgY anti-VIM-2-producing *P. aeruginosa* promoted inhibition of in vitro growth of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* carriers of bla OXA-23, bla SPM-1, bla VIM-2, respectively. In both cases, inhibition happened in a dose-dependent way. Our results suggest immunotherapy with IgY to be an alternative to the treatment of infections caused by *A. baumannii* and *P. aeruginosa* multiresistant to antimicrobials.

**Keywords:** *A. Baumannii*. *P. Aeruginosa*. Bacterial resistance. Immunotherapy. Avian.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Níveis de anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 presentes no soro de galinhas poedeiras imunizadas com *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos .....47
- Figura 2** – Perfil eletroforético do anticorpo IgY extraído da gema do ovo de galinhas imunizadas com bactérias multirresistentes aos antimicrobianos .....48
- Figura 3** – Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *A. baumannii* produtora de OXA-23 após a 5ª e 7ª imunização .....49
- Figura 4** – Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora SPM-1 após a 5ª imunização .....50
- Figura 5** – Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora SPM-1 após a 7ª imunização .....51
- Figura 6** – Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora VIM-2 após a 5ª imunização .....52
- Figura 7** – Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora VIM-2 após a 7ª imunização .....53
- Figura 8** – Reconhecimento de antígenos bacterianos de *A. baumannii* produtora de OXA-23, *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 por anticorpos IgY específicos e inespecíficos, extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras .....54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Caracterização dos isolados clínicos produtores de Carbapenemases .....46
- Tabela 2** – Unidade de ELISA dos anticorpos extraídos da gema após a 5<sup>a</sup> imunização. Densidade óptica (D.O) a partir de 0,2.....47
- Tabela 3** – Unidade de ELISA dos anticorpos extraídos da gema após a 7<sup>a</sup> imunização. Densidade óptica (D.O) a partir de 0,2.....48

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
2.1	BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES e RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	12
2.2	CARBAPEMASES.....	13
2.3	ANTICORPOS IGY .....	15
2.4	IGY NA IMUNOTERAPIA.....	18
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4</b>	<b>ARTIGO: ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE ANTICORPOS IGY CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES AOS ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A emergência de bactérias Gram-negativas, multirresistente aos antimicrobianos, é um constante desafio para os profissionais da saúde. Nesse contexto, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são importantes agentes causadores de infecções hospitalares de difícil tratamento, principalmente em razão da alta incidência de cepas bacterianas portadoras de múltiplos genes de resistência a antimicrobianos (EL ZOWALATY *et al.*, 2015).

Estes microrganismos são amplamente encontrados em todo o ambiente hospitalar. Há relatos de cepas isoladas em leitos, telefones, estetoscópios, catéteres, aparelhos de ventilação mecânica e até mesmo nas mãos dos profissionais, tais como enfermeiros e médicos. Portanto, esses bacilos contribuem diretamente pelas altas taxas de morbi-mortalidade e aumento do tempo de internação dos pacientes, com elevados custos para o hospital (HONG *et al.*, 2015).

As bactérias *A. baumannii* e *P. aeruginosa* têm diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos de escolha terapêutica e tem uma disseminação rápida pelo ambiente hospitalar, o que tem tornado o tratamento cada vez mais difícil (MENDES *et al.*, 2006). Sendo assim, há a necessidade de se investigar novas estratégias terapêuticas, como por exemplo, a terapia com anticorpos IgY extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras. Estudos sobre essa metodologia já demonstraram a eficácia desses anticorpos contra infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias (SCHADE *et al.*, 2005; SPILLNER *et al.*, 2012).

O uso de anticorpos IgY apresenta diversas vantagens quando comparado ao uso de anticorpos de mamíferos, como a obtenção de altos níveis de anticorpos a partir da gema do ovo, de onde os anticorpos podem ser extraídos sem necessidade de sangria do animal, o que também pode gerar um menor custo de produção. (NARAT, 2003; SCHADE *et al.*, 2005). Outra vantagem, é que os anticorpos IgY não ativam o sistema complemento dos mamíferos, devido às diferenças na porção Fc dos anticorpos das aves e mamíferos, além de não apresentarem reações cruzadas com os fatores reumatóides, fazendo com que ocorram menos resultados falsos positivos, o que torna esses anticorpos uma notável alternativa para imunoterapia (LARSSON; SJÖQUIST, 1990).

Devido as diversas vantagens apresentadas pela terapia com anticorpos IgY, neste trabalho avaliou-se a ação de anticorpos IgY contra cepas de *A. baumannii* e

*P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos e produtoras de carbapenemases. Desta maneira este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de produtos inovadores para o tratamento de infecções por bacilos gram-negativos e para o conhecimento científico na área de imunoterapia passiva.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A emergência e disseminação de bactérias resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos tem se tornado uma das principais ameaças a saúde pública mundial. Infecções causadas por patógenos multirresistentes e pan-resistentes estão intimamente associadas às altas taxas de morbidade/mortalidade, ao prolongamento da hospitalização dos pacientes, e ao aumento dos custos hospitalares devido às opções terapêuticas antimicrobianas limitadas disponíveis (HONG *et al.*, 2015).

Os Bacilos Gram negativos não fermentadores da Glicose, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, são microrganismos encontrados comumente na natureza, no entanto, podem causar uma variedade de infecções hospitalares e comunitárias incluindo sépsese, pneumonia, infecções do trato urinário, infecção dos tecidos moles, de ferida cirúrgica e de queimaduras (EL ZOWALATY *et al.*, 2015). Estes microrganismos são freqüentemente isolados de pacientes imunocomprometidos, hospitalizados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), que foram submetidos a procedimentos invasivos, que fizeram uso de terapia imunossupressora ou que realizaram transplante de órgãos (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

Devido à resistência intrínseca e adquirida apresentada por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* apenas classes limitadas destes antimicrobianos são eficazes no tratamento das infecções causadas por estes patógenos. Dentre os antimicrobianos utilizados para tratar infecções por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes, os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem, biapenem e doripenem) são considerados os  $\beta$ -lactâmicos de escolha. Estes fármacos apresentam elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), notável estabilidade às beta lactamases de espectro estendido (ESBL) produzidas, e ótima permeabilidade nas membranas externas bacterianas (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011).

No entanto, verifica-se um crescente aumento no número de isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos em decorrência de mecanismos como: 1) diminuição da permeabilidade por mutações que levam a

perda de porinas, dificultando a permeabilidade do antimicrobiano na célula bacteriana; 2) hiperexpressão de bombas de efluxo resultando na extrusão de antimicrobianos; 3) modificações do sítio da ação do antimicrobiano, substituindo o alvo original e 4) produção de carbapenemases (MENDES *et al.*, 2006).

## 2.2 CARBAPENEMASES

Entre os vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos, a produção de carbapenemases é o principal mecanismo que *A. baumannii* e *P. aeruginosa* adquirem resistência aos carbapenêmicos. A emergência e a disseminação das cepas bacterianas produtoras de carbapenemase coloca em risco o tratamento de infecções utilizando os carbapênemicos, gerando uma preocupação mundial (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; MASTERTON, 2009).

As carbapenemases são enzimas da família das  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar praticamente todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos disponíveis na terapêutica. Essas enzimas, em geral, são codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, integrons e transposons que facilitam a sua transferência entre diferentes espécies ou gêneros bacterianos (ROSSOLINI *et al.*, 2007).

A classificação molecular de Ambler divide essas enzimas em quatro classes (A a D). As classes A, C e D apresentam o aminoácido serina em seu sítio ativo e a classe B que requer um íon metálico divalente como co-fator, geralmente o  $Zn^{2+}$ , e recebem, então, a denominação de metalo-beta-lactamases (MBL) (AMBLER, 1980). Estas enzimas são, usualmente, transferidas por plasmídeos facilitando a sua disseminação e aquisição por cepas bacterianas (MELETIS; CHATZIDIMITRIOU; MALISIOVAS, 2015).

Várias MBL tem sido identificadas em *P. aeruginosa* e/ou *A. baumannii*: IMP (imipenemase) (WATANABE *et al.*, 1991), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI *et al.*, 1999), NDM (New Delhi metallo-  $\beta$ -lactamase), SPM (São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase) (TOLEMAN *et al.*, 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA *et al.*, 2004) e SIM (Seoul imipenemase) (LEE *et al.*, 2005), DIM (Dutch imipenemase), KHM (Kyorin Health Science MBL 1), TMB-1 (Tripoli metallo -  $\beta$ -lactamase), FIM-1 (Florence imipenemase) e AIM (Adelaide imipenemase) (ZHAO; HU, 2015).

Dos subgrupos de MBL identificados a IMP e a VIM, são os grupos mais frequentes, encontradas em várias cepas bacterianas em diversos países. A IMP -1 foi identificada a primeira vez em isolados *Serratia marcescens*, no Japão, em 1991 e em 1997, e a VIM-1 foi identificada em isolado de *P. aeruginosa* em Verona, na Itália (BERTONCHELI; HORNER, 2008; LAURETTI *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 1991; ZHAO; HU, 2015). Na França, em 1996, foi identificada pela primeira vez, em *P. aeruginosa* a MBL VIM-2, uma variante do grupo VIM mais disseminada mundialmente, relatada em diferentes espécies bacterianas e diversas regiões geográficas (BERTONCHELI; HORNER, 2008).

No Brasil, a SPM-1 é a MBL prevalente, a qual foi pela primeira vez identificada em amostras de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Desde então, SPM-1 só foi encontrada em *P. aeruginosa* (BERTONCHELI; HORNER, 2008; TOLEMAN *et al.*, 2002; ZHAO; HU, 2015).

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é a produção de carbapenemases da classe D de Ambler (*Carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase-CHDLs*), sendo essas enzimas as mais prevalentes em *A. baumannii*. Essas enzimas foram classificadas em subgrupos conhecidos como: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA 58, OXA-143, OXA- 213, OXA-214, OXA-229 e OXA-235 (EVANS; AMYES, 2014).

A enzima OXA-23 foi identificada pela primeira vez em isolados de *A.baumannii* no Reino Unido em 1985. Ela é a mais comum e mais disseminada carbapenemase encontrada em *A. baumannii* mundialmente, sendo reportada na Europa, América do Norte, América do Sul e Ásia. Quando produzida por cepas de *A. baumannii*, essa enzima pode estar relacionada à resistência ao tratamento por carbapenêmicos (EVANS; AMYES, 2014; HÉRITIER *et al.*, 2005).

A emergência de cepas bacterianas portadoras de vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos tem gerado uma preocupação mundial, principalmente porque dentro dos últimos 25 anos, o número de desenvolvimento de novas classes destes fármacos diminuiu continuamente e os existentes não são mais eficazes no tratamento a doenças infecciosas. Assim, infecções comuns que por décadas têm sido tratadas podem novamente ter um impacto prejudicial ao hospedeiro, caso novas estratégias não forem desenvolvidas (MAISCH, 2015).

Antes da descoberta dos antibióticos, a terapia com anticorpos foi primeiramente utilizada para o tratamento de infecções humanas. Na década de 1890 e no início do século 20, essa terapia foi utilizada no tratamento de doenças causadas por agentes bacterianos como *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, entre outras (GUIMARÃES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008). Desde então os anticorpos monoclonais e policlonais são utilizados não apenas na imunoterapia, mas também em pesquisas e imunodiagnóstico, os quais, atualmente, são produzidos em mamíferos, como cavalos, ovelhas, coelhos e ratos (NARAT, 2003).

A produção dos anticorpos em mamíferos apesar de promover muitos benefícios, apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, dificuldades com o bem estar animal, uma vez que para obtenção desses anticorpos é necessário sangrar o animal, e no caso de anticorpos monoclonais o sacrifício do animal para retirada do baço (NARAT, 2003).

Em 1983, Klemperer, um pesquisador alemão, demonstrou pela primeira vez que anticorpos específicos produzidos em galinhas, em resposta à imunização, são transferidos para a gema do ovo. Esse resultado estimulou a produção de mais conhecimento sobre a produção de anticorpos em aves, principalmente quando o bem estar animal tornou-se uma questão ética. Desde a década de 1980, há uma aplicação mais ampla dos anticorpos extraídos da gema de ovo de galinhas, devido a diversos relatos sobre os vários aspectos da tecnologia IgY como a criação de galinhas poedeiras, a transferência, purificação da IgY e sua utilidade em diagnósticos, profilaxia e terapia (GUIMARÃES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008; SCHADE *et al.*, 2005).

### 2.3 ANTICORPOS IgY

O sistema imune dos animais vertebrados apresentam dois mecanismos de defesa, o inato e o adaptativo. Ambos foram desenvolvidos para proteger um organismo da invasão de microrganismos, substâncias estranhas e células malignas (SCHADE *et al.*, 2005). A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo, respondendo rapidamente contra organismos invasores de maneira padronizada e inespecífica. Já a resposta adaptativa é específica, responde de maneira mais eficiente aos casos de persistência de um mesmo organismo

(CARLANDER, 2002; MORGULIS, 2002) e pode ser dividida em resposta imune celular e humoral (SCHADE *et al.*, 2005).

Como nos mamíferos, a resposta imune humoral das aves envolvem células B e plasmócitos, os quais são responsáveis pela produção e secreção das imunoglobulinas. As células B são linfócitos não estimulados e imaturos, que em contato com o antígeno ou quando estimuladas pelas células T CD4+, diferenciam-se em plasmócitos (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010).

As imunoglobulinas são glicoproteínas que se ligam especificamente a antígenos, e tem como principais funções a ativação do complemento, opsonização, neutralização, e podem também desencadear reações como precipitação e aglutinação (CARLANDER; STALBERG; LARSSON, 1999).

Nas aves são relatadas 3 classes de imunoglobulinas, IgA, IgM e IgY. (CARLANDER; STALBERG; LARSSON, 1999) diferente dos mamíferos, que apresentam cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgG, IgM, IgD, IgE (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Nas aves a diversidade de imunoglobulinas ocorre por conversão gênica, mecanismo de geração de diversidade diferente da recombinação gênica, observada em mamíferos (SCHADE *et al.*, 2005).

A IgA e IgM das aves são equivalentes às encontradas nos mamíferos, quanto a composição, peso molecular e mobilidade eletroforética (CARLANDER; STALBERG; LARSSON, 1999). A IgA, é a principal imunoglobulina encontrada nas mucosas dos aparelhos digestivo, respiratório e reprodutor, além das glândulas de Harder, sendo produzidas comumente após o 5º dia de exposição ao antígeno (LESLIE; CLEM, 1969; LESLIE; MARTIN, 1973; WATANABE; KOBAYASHI; ISAYAMA, 1975). Já a IgM é o receptor de membrana plasmática predominante nos linfócitos B, considerada a imunoglobulina de fase aguda, a qual é produzida durante a resposta imune primária (LESLIE; CLEM, 1969).

Nas aves, a principal imunoglobulina produzida na resposta imune secundária é a IgY (SILVA; TAMBOURGI, 2010; WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Essas imunoglobulinas são encontradas no soro desses animais e podem ser transferidas para gema do ovo dos mesmos, e por isso recebe o nome de IgY que faz referência ao termo inglês *Yolk*, que significa gema (LESLIE; CLEM, 1969).

Os anticorpos IgY possuem uma estrutura molecular constituída de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, como os anticorpos IgG de mamíferos. A cadeia pesada da IgY consiste de um domínio variável e quatro domínios constantes

(CH1, CH2, CH3 e CH4), que conferem a cadeia pesada uma massa molecular de aproximadamente 65 kDa, enquanto a cadeia pesada da IgG de mamíferos contém apenas três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3) com uma massa molecular de 50 kDa. A massa molecular de IgY e IgG é de 180 kDa e 150 kDa, respectivamente. Ambos os anticorpos apresentam uma cadeia leve constituída de um domínio variável e um domínio constante, com uma massa molecular entre 19 kDa - 23 kDa (SILVA; TAMBOURGI, 2010; SPILLNER *et al.*, 2012).

Os anticorpos IgY apresentam uma flexibilidade limitada em relação a IgG, devido a presença de resíduos de prolina e glicina em seus domínios constantes (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Outra característica da IgY é a estabilidade em temperatura entre 60 e 65°C (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012) e pH de 4 a 11 enquanto a IgG é estável em um temperatura inferior a 70°C e pH de 3 a 10 (HATTA *et al.*, 1993; SHIMIZU *et al.*, 1992; ZHANG, 2003). Como ocorre na IgG dos mamíferos, a região Fc da IgY aviária é responsável por suas funções biológicas efetoras como a fixação do complemento, opsonização. A transferência dos anticorpos IgY para o saco vitelínico também é dependente da porção Fc, uma vez que esse processo é mediado por receptores (CARLANDER; STALBERG; LARSSON, 1999; NOLL; LUTSCH; BIELKA, 1982; SCHADE *et al.*, 2005).

As IgY são diretamente secretadas na circulação, pelos plasmócitos, com uma meia vida que dura cerca de 36 a 65 horas (SCHADE *et al.*, 2005). Esses anticorpos atingem uma concentração de 1,0-1,5 mg/ml no soro (DAVIES *et al.*, 1995), que é mantida constante devido ao equilíbrio entre a síntese da IgY e sua transferência para a gema do ovo. A transferência da IgY do soro das aves para a gema do ovo, demora cerca de 5 dias (MOHAMMED *et al.*, 1998), e é um processo de imunização passiva, na qual a gema se torna uma fonte de anticorpos para proteção de pintainhos novos, durante os primeiros dias após eclosão. As concentrações do anticorpo IgY variam de 50 a 100 mg por gema de ovo (GUIMARÃES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008), no entanto, estudos tem observado que essas concentrações podem variar entre os indivíduos, linhagens genéticas ou raças (NARAT, 2003).

## 2.4 IGY NA IMUNOTERAPIA

São muitas as vantagens da utilização da IgY na pesquisa, imunodiagnóstico e imunoterapias em relação ao uso de IgG de mamíferos (NARAT, 2003). A manutenção de galinhas gera um custo mais baixo em relação à manutenção de coelhos, além disso, a produção de anticorpos em uma galinha corresponde ao de um mamífero, tal como uma ovelha ou uma cabra. Uma galinha pode produzir aproximadamente 17-35g de IgY total por ano, dos quais 10% são específicos para antígenos (SCHADE *et al.*, 2005). Como em galinhas esses anticorpos são transferidos para a gema do ovo a extração da IgY torna-se menos trabalhosa, com baixo custo econômico e menos invasiva, conseqüentemente menos dolorosa garantindo o bem-estar animal (SCHADE *et al.*, 2005).

Outras vantagens relatadas em relação ao uso da IgY são a distância filogenética, que contribui para que a produção de anticorpos IgY em resposta a um antígeno de mamíferos seja mais eficiente do que a própria IgG de mamíferos (LARSSON, SJÖQUIST, 1990); a não interação com fatores reumatóides (autoanticorpos que reagem com a porção Fc da IgG de mamíferos) (KUMAR *et al.*, 2010); a não ativação da cascata do complemento dos mamíferos e a não interação com os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas presentes na superfície de células de mamíferos (SCHMIDT *et al.*, 1993).

A imunidade passiva de anticorpos IgY vem sendo amplamente estudada para conferir uma imunidade protetora em seres humanos e animais contra vários patógenos, principalmente a agentes virais e bacterianos causadores de doenças, tornando uma alternativa interessante no controle de organismos resistentes a antibióticos e não responsivos à antibioticoterapia (CHALGHOUMI; BECKERS; THÉWIS, 2009).

A transferência de anticorpos pode ser realizada por via intravenosa ou oral. Esta última, é a via de escolha para o tratamento das infecções do trato gastrointestinal (CHALGHOUMI; BECKERS; THÉWIS, 2009).

Muitos patógenos ao colonizar um organismo precisam aderir às células desse hospedeiro, principalmente a mucosa intestinal e respiratória, de maneira efetiva para garantir a invasão (SCHADE *et al.*, 2005). Neste sentido, estudos tem demonstrado que administração oral de IgY específica é capaz de reduzir a aderência de *P. aeruginosa* no trato respiratório de pacientes portadores de fibrose

cística e, assim, diminuir a necessidade do uso de antibióticos por esses pacientes (KOLLBERG *et al.*, 2003; NILSSON *et al.*, 2007), reduzir os níveis de bactérias *Solobacterium moorei* na cavidade oral de camundongos (LI *et al.*, 2012), e reduzir a perda óssea alveolar em camundongos com doença periodontal causada por *Fusobacterium nucleatum* (XU *et al.*, 2012).

Os anticorpos IgY também foram efetivos no controle de infecções bucais causadas pela levedura *Candida albicans*, diminuindo a capacidade desses microorganismos de aderirem a células humanas, e a próteses dentárias (IBRAHIM *et al.*, 2008; KAMIKAWA *et al.*, 2016) e reduzir a gravidade das lesões da língua de camundongos (IBRAHIM *et al.*, 2008). Takeuchi *et al.* (2014) mostrou que o uso do gel de hidratação oral a base de IgY por idosos, reduz significativamente a presença de colônias de *C. albicans* em *swabs*, diminuindo o risco de candidíase oral.

O controle de infecções gastrointestinais por anticorpos IgY foi demonstrado em diversos estudos, os quais mostraram o bloqueio da adesão da *Salmonella enteric* serovars Enteritidis e Typhimurium em células intestinais humanas *in vitro* (CHALGHOUMI *et al.*, 2009) e a interferência da IgY no desenvolvimento de úlcera gástrica por *Helicobacter pylori* (SHIN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2014). Outro estudo, mostrou que, em modelo murino, a administração oral de IgY retardou o aparecimento de diarreia em indivíduos submetidos a infecção por *Clostridium difficile*. Além disso, a IgY foi capaz de reduzir a adesão de esporos da bactéria *Clostridium difficile* em células intestinais *in vitro* (PIZARRO-GUAJARDO *et al.*, 2017).

Em infecções de pele causadas por bactérias *Propionibacterium acnes*, os anticorpos IgY específicos foram capazes de reduzir significativamente a adesão e o crescimento de colônias de *P. acnes* *in vitro* (REVATHY *et al.*, 2014).

Estudos *in vitro* mostraram a atividade antimicrobiana do IgY contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* sendo capaz de afetar o crescimento dessas bactérias causadoras de mastite em bovinos (GUIMARÃES *et al.*, 2009; ZHEN *et al.*, 2008a, 2008b; WANG *et al.*, 2011).

Na aquicultura, espécies de bactérias e vírus tem provocado preocupação dos cultivadores uma vez que infecções tem levado a mortalidade de peixes teleósteos e camarões, entretanto, estudos tem mostrado que IgY específica confere proteção desses peixes contra *Vibrio aguillarum*, causador da Vibriose (ARASTEH *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2014), e de *Yersinia ruckerii* diminuindo a

mortalidade (LEE *et al.*, 2000). Esse efeito protetor também foi demonstrado no tratamento com IgY anti WSSV (*white spot syndrome vírus*) em camarões infectados (KIM *et al.*, 2004).

IgY foi capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* (SUI; CAO; LIN, 2011) e *Shewanella putrefaciens* em amostras de carne de peixe fresco (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que IgY contra *Piscirickettsia salmonis* foi capaz de afetar o crescimento dessa bactéria causadora de infecção em salmões (OLIVER *et al.*, 2015).

Vários estudos, tem demonstrado resultados promissores no tratamento profilático e terapêutico de IgY contra diferentes infecções virais, incluindo vírus influenza A e B (NGUYEN *et al.*, 2010; WALLACH *et al.*, 2011), infecção por rotavírus humano (RV) (DAI *et al.*, 2013; VEGA *et al.*, 2012;) e por norovírus humano (NoV) (DAI *et al.*, 2013).

A atividade da IgY contra protozoários foi relatada em estudos que verificaram que camundongos infectados com *Trypanosoma evansi* tiveram uma maior sobrevivência quando tratados com IgY (SAMPAIO *et al.*, 2014) e que aves infectadas com *Eimeria tenella* e *Eimeria maxima* apresentaram menor perda de peso, menor lesão intestinal e redução na produção de oócitos nas fezes dos animais tratados com IgY (LEE *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm mostrado o efeito inibitório e terapêutico de anticorpos IgY contra diferentes espécies de bactérias, fungos, vírus e protozoários. Esses resultados sugerem que a IgY pode ser utilizada como uma estratégia alternativa ao tratamento de muitas doenças infecciosas graves aos seres humanos e animais. Deste modo, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de anticorpos IgY contra bactérias, causadoras de infecções hospitalares graves, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamase. **Philosophical Transaction of the Royal Society London B: biological science**, London, v. 289, n. 1036, p. 321-331, maio 1980.
- ARASTEH, N.; AMINIRISSEHEI, A. -H.; YOUSIF, A. N.; ALBRIGHT, L. J.; DURANCE, T. D. Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, p. 23–36, mar. 2004.
- BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, dez. 2008.
- CARLANDER, D. **Avian IgY antibody: in vitro and in vivo**. 2002. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Universitatis Upsaliensis, Upsala, 2002.
- CARLANDER, D.; STALBERG, J.; LARSSON, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Upsala Journal of Medical Sciences**, London, v. 104, n. 3, p. 179-190, 1999.
- CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, R. N.; SCHMIDT, F. J.; WALSH, T. R. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4654-4661, dez. 2004.
- CHALGHOUMI, R.; BECKERS, Y.; THÉWIS, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 295-308, Jan. 2009.
- CHALGHOUMI, R.; THÉWIS, A.; BECKERS, Y.; MARCQ, C.; PORTETELLE, D.; SCHNEIDER, Y. J. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enteric* Serovars Enteritidis and Typhimurium *in vitro*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 6, n. 5, p. 593-604, June 2009.
- DAI, Y. -C.; ZHANG, X. -F.; TAN, M.; HUANG, P.; LEI, W.; FANG, H.; ZHONG, W.; JIANG, X. A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 293–300, Mar. 2013.
- DAVIES, E. L.; SMITH, J. S.; BIRKETT, C. R.; MANSER, J. M.; ANDERSON-DEAR, D. V.; YOUNG, J. R. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 186, n. 1, p. 125-135, out. 1995.
- EL ZOWALATY, M. E.; AL THANI, A. A.; WEBSTER, T. J.; EL ZOWALATY, A. E.; SCHWEIZER, H. P.; NASRALLAH, G. K.; MAREI, H. E.; ASHOUR, H. M. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing

resistance profiles, and future antimicrobial therapies. **Future Microbiology**, London, v. 10, n. 10, Oct. 2015.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, p. 241-263, Apr. 2014.

FIGUEIREDO, D. Q.; CASTRO, L. F. S.; SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; MONDINO, S. S. B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 177-184, jun. 2009.

GAO, X.; ZHANG, X.; SUN, J.; DU, X.; LI, X.; ZHANG, Y.; LIN, L. Passive protection effect of anti-*Vibrio anguillarum* IgY-encapsulated feed on half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) against *V. Anguillarum*. **Fish Shellfish Immunology**, London, v. 56, p. 483-488, set. 2016.

GUIMARÃES, M. C. C.; CORREIA, V. G.; GAMA FILHO, R. V. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas on line**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 7, p. 122-129, 2008.

GUIMARÃES, M. C.; AMARAL, L. G.; RANGEL, L. B.; SILVA, I. V.; MATTA, C. G.; MARRA, M. F. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archives of Immunology and Experimental Therapy**, Warszawa, v. 57, n. 5, p. 377-382, Sept./Aug. 2009.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 57, n. 3, p. 450-454, Mar. 1993.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; FOURNIER, P. E.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D.; NORDMANN, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 10, p. 4174-4179, out. 2005.

HONG, D. J.; BAE, I. K.; JANG, I. H.; JEONG, S. H.; KANG, H. K.; LEE, K. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & Chemotherapy**, Seoul, v. 47, n. 2, p. 81-97, June 2015.

IBRAHIM, EI-S. M.; RAHMAN, AK.; ISODA, R.; UMEDA, K.; VAN SA, N.; KODAMA, Y. *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, n. 17, p. 2073–2080, Apr. 2008.

KAMIKAWA, Y.; FUJISAKI, J.; NAGAYAMA, T.; KAWASAKI, K.; HIRABAYASHI, D.; HAMADA, T.; SAKAMOTO, R.; MUKAI, H.; SUGIHARA, K. Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis. **Gerodontology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 342-347, Sept. 2016.

KIM, D. K.; JANG, I. K.; SEO, H. C.; SHIN, S. O.; YANG, S. Y.; KIM, J. W. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a

truncated fusion protein derived from WSSV. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1-4, p. 21–30, Aug. 2004.

KOLLBERG, H.; CARLANDER, D.; OLESEN, H.; WEJÅKER, P. E.; JOHANNESSEN, M.; LARSSON, A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. **Pediatric Pulmonology**, Philadelphia, v. 35, n. 6, p. 433-440, June 2003.

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

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LARSSON, A.; SJOQUIST, J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 199-201, 1990.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobiol Agents Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, Jul. 1999.

LEE, K.; YUM, J. H.; YOUNG, D.; LEE, H. M.; KIM, H. D.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>SIM-1</sub>*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobiol Agents Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, Nov. 2005.

LEE, S. B.; MINE, Y.; STEVENSON, R. M. Effects of hen egg immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 1, p. 110-5, Dec. 2000.

LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S.; PARK, D. W.; JANG, S. I.; MORALES, A.; GARCÍA, D.; LUCIO, E.; LARIOS, R.; VICTORIA, G.; MARRUFO, D.; LILLEHOJ, E. P. Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, n. 1-2, p.123-126, Jul. 2009.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, Baltimore, v. 130, n. 6, p. 1337-52, Nov. 1969.

LESLIE, G. A.; MARTIN, L. N. Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 110, n. 1, p.1-9, Jan. 1973.

LI, C. H.; LU, X. J.; LI, D. F.; CHEN, J. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 37, n. 1, p. 108-

114, mar. 2014.

LI, X.; LIU, H.; XU, Y.; XU, F.; WANG, L.; YOU, J.; LI, S.; JIN, L. Chicken egg yolk antibody (IgY) controls *Solobacterium moorei* under in vitro and in vivo conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 168, n. 6, p. 1448-1458, Sept. 2012.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 8, ago. 2015.

MASTERTON, R. G. The new treatment paradigm and the role of carbapenems. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Los Angeles, v. 33, n. 2, p. 105, Feb. 2009.

MELETIS, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; MALISIOVAS, N. Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 34, n. 8, p. 1487-93, Aug. 2015.

MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo- $\beta$ -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 2, abr. 2006.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 552-80, set. 2010.

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

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.

NARAT, M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 3, p. 259-267, Jun. 2003.

NGUYEN, H. H.; TUMPEY, T. M.; PARK, H. J.; BYUN, Y. H.; TRAN, L. D.; NGUYEN, V. D.; KILGORE, P. E.; CZERKINSKY, C.; KATZ, J. M.; SEONG, B. L.; SONG, J. M.; KIM, Y. B.; DO, H. T.; NGUYEN, T.; NGUYEN, C. V. Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Avian Antibodies Against Influenza Virus H5N1 and H1N1 in Mice. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 4, Apr. 2010.

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**, Amsterdam, v. 856, p. 75-80, Sept. 2007.

NOLL, F.; LUTSCH, G.; BIELKA, H. Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-

antibody complexes as studied by electron microscopy. **Immunology letters**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 117-23, Mar. 1982.

OLIVER, C.; VALENZUELA, K.; SILVA, H.; HARO, R. E.; CORTÉS, M.; SANDOVAL, R.; PONTIGO, J. P.; ÁLVAREZ, C.; FIGUEROA, J. E.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; TRONCOSO, J. M.; YÁÑEZ, A. J. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin against the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, p. 365-37, May 2015.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, Nov. 2011.

PIZARRO-GUAJARDO, M.; DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; ÁLVAREZ-LOBOS, M.; PAREDES-SABJA, D. Characterization of chicken IgY specific to *Clostridium difficile* R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 365, Aug. 2017.

REVATHY, J.; KARTHIKA, S.; SENTILA, R.; MICHAEL, A. *In vitro* evaluation of the efficacy of chicken egg yolk antibodies (IgY) generated against *Propionibacterium acnes*. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 68-73, Feb. 2014.

ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E.; DOCQUIER, J. D.; MUSMANNO, R. A.; CORATZA, G. Epidemiology of infections caused by multiresistant Gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. **New Microbiologica**, Pavia, v. 30, n. 3, p. 332-339, 2007.

SAMPAIO, L. C. L.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; GRESSLER, L. T.; CAPELETO, D. M.; SA, M. F.; JESUS, F. P. K.; SANTOS JUNIOR, A. G.; ANCIUTI, A. N.; COLONETTI, K.; STAINKI, D. R.; MONTEIRO, S. G. Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 204, n. 3, p. 96-103, Aug. 2014.

SCHADE, R.; GUTIERREZ CALZADO, E.; SARMIENTO, R.; ANIBAL CHACANA, P.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **ATLA**, London, v. 33, n. 2, p. 1-26, May 2005.

SCHMIDT, P.; ERHARD, M. H.; SCHAMS, D.; HAFNER, A.; FOLGER, S.; LÖSCH, U. Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth hormone and prolactin in bovine pituitary gland. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 41, n. 9, p. 1441-1446, Sept. 1993.

SCHNEIDER, H.; GEGINAT, G.; HOGARDT, M.; KRAMER, A.; DÜRKEN, M.; SCHROTEN, H.; TENENBAUM, T. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology care unit caused by an errant water jet into contaminated siphons. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 31, n. 6, p. 648-650, June 2012.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G.

**Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 2, p. 270-274, Feb. 1992.

SHIN, J. H.; YANG, M.; NAM, S. W.; KIM, J. T.; MYUNG, N. H.; BANG, W. G.; ROE, I. H. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 5, p. 1061-1066, Sept. 2002.

SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 135, p. 173-180, jun. 2010.

SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, London, v. 40, n. 5, p. 313-322, Sept. 2012.

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 11, p. 1946-1950, Apr. 2011.

TAKEUCHI, S.; MOTOHASHI, J.; KIMORI, H.; NAKAGAWA, Y.; TSURUMOTO, A. Effects of oral moisturising gel containing egg yolk antibodies against *Candida albicans* in older people. **Gerodontology**, Mount Desert, v. 33, n. 1, p. 128-134, July 2014.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; GALES, A. C.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 50, n. 5, p. 673-679, Nov. 2002.

VEGA, C. G.; BOK, M.; VLASOVA, A. N.; CHATTHA, K. S.; FERNÁNDEZ, F. M.; WIGDOROVITZ, A.; PARREÑO, V. G.; SAIF, L. G. IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 8, Aug. 2012.

WALLACH, M. G.; WEBBY, R. J.; ISLAM, F.; WALKDEN-BROWN, S.; EMMOTH, E.; FEINSTEIN, R.; GRONVIK, K. O. Cross-protection of chicken immunoglobulin y antibodies against H5N1 and H1N1 viruses passively administered in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, n. 7, p. 1083-1090, July 2011.

WANG, B.; YANG, J.; CAO, S.; WANG, H.; PAN, X.; ZHU, J.; ZHOU, Y.; GAO, L.; LI, W.; LI, M. Preparation of specific anti-*Helicobacter pylori* yolk antibodies and their antibacterial effects. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v. 7, n. 10, p. 6430-6437, Sept. 2014.

WANG, L. H.; LI, X. Y.; LIN, L. J.; YOU, J. S.; ZHOU, Y.; LI, S. Y.; XU, Y. P. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 149, n. 3/4, p. 415-421, May 2011.

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

WATANABE, H.; KOBAYASHI, K.; ISAYAMA, Y. Peculiar secretory IgA system identified in chickens. II. Identification and distribution of free secretory component and immunoglobulins of IgA, IgM, and IgG in chicken external secretions. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 115, n. 4, p. 998-1001, Oct. 1975.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 35, n. 1, p. 147-151, Jan. 1991.

XU, F. X.; XU, Y. P.; JIN, L. J.; LIU, H.; WANG, L. H.; YOU, J. S.; LI, S. Y.; LI, X. Y. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against periodontal disease-causing *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 4, p. 983-991, June 2012.

ZHANG, Q.; LIN, H.; SUI, J.; WANG, J.; CAO, L. Effects of Fab' fragments of specific egg yolk antibody (IgY-Fab') against *Shewanella putrefaciens* on the preservation of refrigerated turbot. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 95, n. 1, p. 136-140, Apr. 2014.

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

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Acquired metallo  $\beta$ -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. **Future Microbiology**, London, v. 10, n. 5, p. 873-887, May 2015.

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; GUO, J.; LI, X. Y.; LI, Z.; FANG, R.; XU, Y. P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 5, p. 1529-1535, Oct. 2008a.

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; GUO, J.; LI, X. Y.; LU, Y. N.; CHEN, J.; XU, Y. P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 1/2, p. 126-133, July 2008b.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos IgY e caracterizar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos mesmos contra bactérias multirresistentes aos antimicrobianos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 multirresistentes aos antimicrobianos.
- Caracterizar imunoquimicamente os anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 por ELISA e *western blotting*.
- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos anticorpos IgY anti-*A. baumannii* e anti-*P. aeruginosa* contra isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos pelo teste de Concentração Inibitória Mínima.

#### 4 ARTIGO

### **Análise da atividade antimicrobiana *in vitro* de anticorpos IgY contra bactérias multirresistentes aos antimicrobianos**

A.C.N.S. Ferraro<sup>1</sup>, F.E de Oliveira<sup>2</sup>, M.C. da Silva<sup>1</sup>, A. M. do Nascimento<sup>1</sup>, E.V. Fernandes<sup>1</sup>, M. Scarone<sup>1</sup>, F.E. Carrara-Marroni<sup>4</sup>, E.J. Venancio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup>Curso de graduação em Farmácia - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

Autor correspondente: Emerson José Venancio. Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, PR, Brazil Tel: +55 43 3371 5766 Fax: +55 43 3371 4267; E-mail: [emersonj@uel.br](mailto:emersonj@uel.br)

## Análise da atividade antimicrobiana *in vitro* de anticorpos IgY contra bactérias multirresistentes aos antimicrobianos

### Resumo

**Objetivo:** Produzir anticorpos IgY específicos para cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistente e determinar sua atividade antimicrobiana *in vitro*. **Métodos e resultados:** IgY específicos foram produzidos por imunização de galinhas poedeiras com 2 cepas de *P. aeruginosa* e uma de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases e portadoras dos genes de resistência aos beta-lactâmicos *bla*<sub>spm-1</sub>, *bla*<sub>vim-2</sub> e *bla*<sub>oxa-23</sub> respectivamente, inativadas com formalina 1%. A IgY foi obtida por meio do processo de precipitação com sulfato de amônia e caracterizada por SDS-PAGE, ELISA e *western blotting*. A ação antimicrobiana foi avaliada pelo teste de concentração inibitória mínima. IgY específicos extraídos da gema demonstraram um intenso reconhecimento dos antígenos bacterianos. O ensaio de atividade antimicrobiana de anticorpos IgY *in vitro*, mostrou que IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, inibiu crescimento de *A. baumannii* portadoras dos genes de resistência *bla*<sub>OXA-23</sub>. Enquanto, a IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 também foram capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* portadoras dos genes de resistência *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-2</sub>, respectivamente. Em ambos os casos a inibição foi dose dependente. **Conclusão:** IgY específicos inibiu o crescimento *in vitro* de bactérias *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Significância e impacto do estudo:** IgY específicos pode ser uma alternativa ao tratamento de infecções por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, resistência bacteriana, imunoterapia, aves.

### Introdução

Os bacilos Gram-negativos (BGN) *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são importantes patógenos oportunistas responsáveis por infecções hospitalares de difícil tratamento, tais como pneumonias, bacteremias, infecções em feridas cirúrgica e infecções do trato urinário (Falagas & Kopterides, 2006).

A emergência de cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, multirresistentes aos antimicrobianos, no ambiente hospitalar tem gerado preocupação por parte dos profissionais da saúde, devido à facilidade desses microrganismos colonizarem aparelhos de ventilação mecânica, catéteres e leitos, e se disseminarem no ambiente hospitalar (Figueiredo, Castro, Santos, Teixeira, & Mondino, 2009).

Os carbapenêmicos são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes da família Enterobacteriaceae e pelos bacilos Gram negativos não fermentadores *A. baumannii*

e *P. aeruginosa*. No entanto, o aparecimento das carbapenemases, capazes de hidrolisar praticamente todas as classes de beta-lactâmicos, tem colocado em risco a terapia com esses antimicrobianos (Figueiredo *et al.* 2009; Masterton 2009).

Em razão do aumento da frequência de isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* portadores de genes codificadores de carbapenemases, é de extrema importância o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas de um modo geral, e de infecções por BGN multirresistentes (Ayraud-Thévenot *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2011).

A produção de anticorpos da classe IgY está se tornando uma alternativa para a imunoterapia, imunodiagnóstico e para a pesquisa em que usualmente são utilizados anticorpos IgG de mamíferos (Narat, 2003). A IgY é uma imunoglobulina encontrada nas aves, homóloga a IgG de mamíferos. Esses anticorpos IgY são transferidos da galinha para o ovo e conferem uma imunidade passiva para o embrião e recém nascido (Kowalczyk, Daiss, Halpern, & Roth 1985; Rollier, Charolloy, Jamard, Trepo, & Cova, 2000).

A transferência em grandes quantidades da IgY para a gema do ovo, garante uma vantagem do uso da IgY em imunoterapia em relação a IgG de mamíferos, porque a extração da IgY torna-se menos trabalhosa, com baixo custo econômico e menos invasiva, conseqüentemente menos dolorosa garantindo o bem estar animal (Schade *et al.*, 2005).

Estudos tem mostrado que a imunidade passiva de anticorpos IgY tem conferido uma imunidade protetora em seres humanos e animais contra doenças causadas por vários patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (Kollberg *et al.*, 2003; Nilsson *et al.* 2007), infecções bucais por *Candida albicans* (Ibrahim *et al.* 2008; Kamikawa *et al.* 2016), perda óssea alveolar por *Fusobacterium nucleatum* (Xu *et al.*, 2012), gastrite por *Helicobacter pylori* (Shin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014), pneumonia por *Acinetobacter baumannii* (Jahangiri *et al.*, 2019), infecção por rotavírus humano (RV) (Dai *et al.* 2013; Vega *et al.*, 2012), vírus influenza A e B (Nguyen *et al.*, 2010; Wallach *et al.*, 2011), infecções por protozoários *Trypanosoma evansi* (Sampaio *et al.*, 2014) e *Eimeria tenella* e *Eimeria maxima* (Lee *et al.*, 2009).

Esses resultados tem demonstrado que a IgY é uma alternativa interessante no controle de organismos multirresistentes a antimicrobianos e não responsivos à antibioticoterapia. Com isso, este estudo teve por objetivo produzir anticorpos IgY

anti-*A. baumannii* e IgY anti-*P. aeruginosa* e avaliar a atividade antimicrobiana desses anticorpos IgY contra *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos e produtoras de carbapenemases.

## **Material e métodos**

### **Cultura Bacteriana**

Foram utilizadas cepas padrão de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes e portadoras dos genes codificadores das carbapenemases *bla*<sub>OXA-23</sub>; *bla*<sub>SPM-1</sub> *bla*<sub>VIM-2</sub> (Tabela 1), respectivamente. Esses isolados clínicos foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cristina Gales do Laboratório Alerta da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As cepas padrão foram crescidas em *Tryptic Soy Broth* (TSB) por 24 horas e mantidas em estufa a 37°C, em seguida a cultura bacteriana foi novamente crescida em biplacas com meio de cultura MacConkey (Difco <sup>TM</sup>) e CHROMagar (Difco <sup>TM</sup>) a 37°C por 24 horas, para confirmar se não ocorreu contaminação e logo após foram armazenadas em microtubos de 1,5 ml contendo ágar nutriente e mantidas a temperatura ambiente.

### **Preparo do Antígeno**

Foram preparadas suspensões bacterianas a  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL inativadas com formalina 1% para serem utilizadas como antígenos para imunização e ELISA. As cepas bacterianas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* produtoras de OXA-23, SPM-1 e VIM-2, respectivamente, armazenadas foram transferidas para caldo TSB a 37°C por 24 horas. Após esse período as subcultura bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos e lavadas 3 vezes com PBS pH 7,4 para retirada do meio de cultura. O *pellet* foi adicionado imediatamente à solução de formalina 1% por 18 horas a 37°C para inativação das bactérias. As suspensões bacterianas foram cultivadas em meio de cultura MacConkey (Difco <sup>TM</sup>) e CHROMagar (Difco <sup>TM</sup>) a 37°C por 24 horas, para confirmar a sua inativação e em seguida ressuspendidas em PBS, e armazenadas a -20°C.

## Animais

Foram utilizadas 9 galinhas *Gallus gallus* da linhagem White Leghorn, com 12 semanas de idade, divididas em 3 grupos, com 3 animais cada. Um grupo foi imunizado com *A. baumannii* produtora de OXA-23, outro com *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e o outro com *P. aeruginosa* produtora de VIM-2. As galinhas foram obtidas e mantidas na Granja da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, em temperatura ambiente, com água e ração *ad libitum*.

A utilização dos animais foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina, sob o protocolo de nº 11983.

## Imunização dos Animais

Os animais foram imunizados com 400 µl da solução de antígeno (200 µl de bactéria  $2,0 \times 10^9$  CFU/mL em 200 µl de adjuvante incompleto de Freund) via intramuscular em dois pontos do peitoral. As imunizações foram realizadas 14, 28, 42, 84, 126 e 168 dias após a primeira imunização. O sangue dos animais foram coletados antes da 1ª imunização e 7 dias após cada imunização. A partir da 4ª imunização foram realizadas as coletas dos ovos, uma semana após cada imunização. Após obtenção do soro e da gema os mesmos foram armazenados à -20°C até o momento do uso.

## Análise da Produção de Anticorpos IgY

Os níveis de anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 após imunoestimulações, foram determinados por ELISA indireto. Placas de microtitulação de 96 poços, Costar®, foram sensibilizadas com 100 µl /poço do antígeno (suspensão bacteriana  $1 \times 10^8$  UFC/mL) em solução de tampão carbonato-bicarbonato de sódio com pH 9,6 e incubadas overnight à 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,4 e bloqueadas com 150 µl /poço PBS leite desnatado 5% (Leite Molico, Nestlé) por 2 horas à 37°C. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 20 (Vetec Química Fina) à 0,05%. Após

lavagem foi adicionado 100µl/poço de soro de galinha diluído 1: 500 em PBS leite 1%, e a placa foi incubada por 1 hora à 37°C. Novamente as placas foram lavadas como descrito anteriormente, e então foram adicionados 100µl/poço de anti-IgY de galinha peroxidase (Bethyl Laboratories) na concentração de 1: 40.000 em PBS leite 1%, seguido de incubação por 1 hora à 37°C.

Após lavagem da placa com PBS-Tween 20 a 0,05 % foi adicionado 100µl/poço da solução de substrato em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,2 contendo 0,1 mg de tetrametilbenzidina (TMBZ, Acrós Organics) e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, FMaia), seguido de incubação à 37°C por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 50µl/poço da solução de ácido sulfúrico (Vetec Química Fina) a 2N para interromper a reação e a densidade óptica foi realizada em um comprimento de onda de 450nm.

### **Purificação dos Anticorpos IgY – SDS-PAGE**

Os anticorpos IgY foram obtidos por meio do processo de precipitação com sulfato de amônia, descrito por Akita e Nakai (1992). As gemas coletadas foram diluídas 1:7 em água ácida pH 2,5 overnight a 4°C e em seguida foram filtradas com papel de filtro para retirada da porção lipídica. Após filtração, foi adicionado sulfato de amônio saturado 1:3 à solução filtrada e mantida em agitação, a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 3.000g por 15 minutos e o precipitado foi ressuscitado em sulfato de sódio 18% e mantido em agitação em temperatura ambiente por 20 min, após esse período a solução foi novamente centrifugada 3.000g e o precipitado ressuscitado em sulfato de sódio 14% em temperatura ambiente sob agitação. A solução foi novamente centrifugada por 20 minutos e ressuscitada em PBS pH 7,4 e armazenada a -20°C. Foi realizado o método de Bradford (1976) para determinar a concentração de proteína da solução de IgY extraída da gema e sua pureza verificada através de eletroforese de gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) 10%, corado com Comassie Blue (Vetec Química Fina).

## **Títulos de Anticorpos Contra *A. baumannii* Produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* Produtoras de SPM-1 e VIM-2**

A titulação dos anticorpos IgY, extraídos da gema, contra *A. baumannii* produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e VIM-2 foi realizada por ELISA indireto como descrito no item acima. Porém, as amostras de IgY foram diluídas seriadamente com fator de diluição 2, a partir de 10 µg/ml até 0,078 µg/ml. As absorbâncias obtidas pelas diluições das IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 foram submetidas ao programa CurveExpert 1.4 e construída uma curva padrão para determinar a unidade de ELISA a partir da O.D de 0,2.

### ***Western blotting***

Para realização da técnica de *western blotting*, as cepas bacterianas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram crescidas em 3 ml de TSB por 24 horas a 37°C, em seguida essa suspensão bacteriana foi centrifugada 3.000g por 15 minutos e ressuspensa com PBS pH 7,4 e novamente centrifugado 3.000g por 15 minutos e descartado o sobrenadante. Esse processo foi repetido por mais 1 vez para retirada do meio de cultura (TSB). Após essa lavagem as bactérias foram suspensas em 500µl de PBS pH 7,4 e armazenadas a -20°C. Para obtenção do perfil eletroforético SDS-PAGE das bactérias, foi preparado um gel de poliacrilamida a 12,5 %, no qual foram adicionados 5 µl da suspensão bacteriana em tampão de amostra redutor (0,5 mL de Tris-SDS pH 6,8; 0,2 g de SDS; 1,5 mL de glicerol; 0,25 mL de 2-mercaptoetanol; 0,0004 g de azul de bromofenol; 1 mL de água destilada). Em seguida, as proteínas bacterianas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por meio da cuba de transferência Minitrans-Blot®cell module (China) a 150 mA *overnight* a 4°C.

A membrana foi submetida a uma solução de Ponceau (0,5g de Ponceau; 0,1 ml de ácido acético; 100 ml de água destilada) para confirmação da transferência das proteínas, após esse processo a membrana foi lavada 3 vezes com água destilada para retirada do Ponceau e incubada com PBS leite desnatado 5% (Leite Molico, Nestlé) a 37°C por 2 horas. Foram realizadas 3 lavagens com PBS pH 7,4 e a membrana foi novamente incubada com 500 µg/ml de anticorpo IgY diluído em

PBS-leite 1% por 1 hora, a temperatura ambiente em agitação. Após esse período foram realizadas 3 lavagens com PBS Tween 20 0,05% e adicionado o anticorpo anti-IgY peroxidase (Bethyl Laboratories) diluído 1:1000 em PBS leite 1%, por 1 hora, em agitação, seguida as lavagens com PBS Tween foi realizada a revelação com 20 mg/ml de DAB Sigma Chemical (de 3,3-diaminobenzidina) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, FMaia).

### **Atividade Antimicrobiana de Anticorpos IgY *in vitro***

Para verificar a atividade antimicrobiana de IgY sobre o crescimento bacteriano de cepas de *A. baumannii* portadora do gene de resistência *bla*<sub>OXA-23</sub> e *P. aeruginosa* portadoras dos genes de resistência *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-2</sub>, os anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2, e IgY inespecífico foram esterilizados com microfiltro 0.22µm (Milipore) e em seguida diluídos em MHB (Mueller Hinton Broth) para atingir a concentração de 5, 1.2, 0.62, 0.31 e 156 mg/ml. As bactérias *A. baumannii* produtora de OXA 23, *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e VIM-2 foram crescidas em meio sólido e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas, em seguida foi preparada uma suspensão bacteriana em PBS pH 7,4 e a concentração bacteriana determinada em 0,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100µl/poço da suspensão bacteriana diluídas 1:100 em TSB e 100µl/poço dos respectivos anticorpos e concentrações. Como controle positivo foi utilizado 100µl/poço de antibiótico Polimixina B 2µg/ml. A leitura das placas foi realizada no leitor de microplacas em um comprimento de onda de 620 nm.

## **Resultados**

### **Análise da Produção de Anticorpos IgY**

O resultado da análise de produção de anticorpos mostrou que 7 dias após a primeira imunização dos animais com *A. baumannii* produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e VIM-2, houve um aumento nos níveis séricos de anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 no soro desses

animais e em relação aos níveis de anticorpos antes da imunização. Em todos os grupos, os níveis de anticorpos IgY específicos foram maiores após a 3ª imunização (Figura 1).

### **Purificação dos Anticorpos IgY – SDS-PAGE**

A técnica de precipitação por sulfato de amônio e sulfato de sódio foi eficiente para obtenção dos anticorpos IgY inespecífico e específicos anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1, e anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 a partir da gema de galinhas poedeiras imunizadas. A extração das IgY foi confirmada pelo método de eletroforese SDS- PAGE, no qual foi possível observar moléculas de massa molecular de 65 kDa e 23kDa (Figura 2), referentes a cadeia pesada e cadeia leve da IgY, respectivamente. Esse perfil eletroforético foi observado para todas IgY analisadas.

### **Títulos de Anticorpos Contra *A. baumannii* Produtora de OXA 23 e *P. aeruginosa* Produtoras de SPM-1 e VIM-2**

Anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 foram analisados por ELISA indireto. Esses anticorpos foram diluídos a partir da concentração de 10 µg/ml até 0,078 µg/ml e determinados os valores de absorbância para construção de uma curva padrão. A partir dessa curva a D.O de 0,2 foi convertida em unidade de ELISA.

Observou-se que os valores de Unidade de ELISA foram próximos para os anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 extraídos da gema após a 5ª e a 7ª imunização (Tabela 2 e 3).

### **Atividade Antimicrobiana de Anticorpos IgY *in vitro***

O teste da atividade antimicrobiana do anticorpo IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23 demonstrou um efeito inibitório desses anticorpos sobre o crescimento de *A. baumannii* produtora de OXA-23, refletido na diminuição da D.O

em relação a D.O do controle de crescimento (C.C) (Figura 3 A). Esse resultado foi observado apenas em 24 horas do experimento. Os anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, extraídos após a 5ª e a 7ª imunização, na concentração de 5mg/ml, foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de *A. baumannii* produtora de OXA-23 em 41% e 45%, respectivamente. Já os anticorpos IgY inespecíficos apresentaram uma diminuição na D.O de apenas 13% (Figura 3 B). Verificou-se que um maior efeito inibitório depende de uma maior dose de IgY. O efeito inibitório do IgY específico também foi observado sobre o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e *P. aeruginosa* produtora de VIM-2. A adição de 5 mg/ml de IgY anti-*P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, extraídos da gema na 5ª e 7ª imunização, promoveu uma inibição no crescimento de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 de 58% (Figura 4 A e B) e 41% (Figura 5 A e B) respectivamente, enquanto que a IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 em 45% (Figura 6 A e B) e 48% (Figura 7 A e B) quando comparados com C.C. Já o IgY inespecífico em 5 mg/ml apresentou uma inibição de apenas 9% e 13% no crescimento de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 Também foi verificado um efeito inibitório dose dependente da IgY anti *P. aeruginosa* SPM e VIM.

### **Western blotting**

O reconhecimento de antígenos das bactérias *A. baumannii* produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e VIM-2 por IgY específicos e inespecífico, extraídos da gema, foi determinado pela análise de *western blotting*. Observou-se que IgY inespecíficos não reconheceram nenhum antígeno das bactérias *A. baumannii* produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e VIM-2. Anticorpo IgY anti-*A. baumannii* produtoras de OXA-23 reconheceu antígenos com peso molecular entre 82-26 kDa. Também foi observado um intenso reconhecimento de antígenos, de alto peso molecular (82-37 kDa), de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 por anticorpo IgY anti *P. aeruginosa* produtora de SPM-1. Já o anticorpo IgY específico para *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 reconheceu antígenos de peso molecular entre 64-37 kDa, e observou também um reconhecimento mais fraco por antígenos entre 26-19 kDa

## Discussão

A crescente emergência mundial de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* portadoras de múltiplos genes de resistência a antimicrobianos têm dificultado o tratamento de infecções graves por esses patógenos, uma vez que há uma limitação na escolha terapêutica. Os carbapenêmicos administrados para o controle e cura dessas infecções em alguns casos já não surtem mais efeito (Figueiredo *et al.*, 2009) e os antimicrobianos Polimixinas B e Colistina (Polimixina E) que apesar de apresentarem uma eficiência contra infecções *A. baumannii* e *P. aeruginosa* MR são neurotóxicos e nefrotóxicos (Vasoo, Barreto, & Tosh, 2015) colocando em risco principalmente pacientes com problemas renais e que necessitam de hemodiálise (El Solh & Alhajhusain, 2009).

Devido a essas dificuldades de tratamento torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra infecções por bactérias Gram negativas multirresistentes. Nesse contexto, a imunoterapia com anticorpos IgY, produzidos em aves e que podem facilmente ser obtidos a partir da gema do ovo, é uma alternativa promissora ao tratamento de infecções por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes, pois estudos tem relatado uma interessante atividade antimicrobiana desses anticorpos contra *P. aeruginosa*, reduzindo a aderência desse microrganismo no trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística (Kollberg *et al.*, 2003; Nilsson, Amini, Wretling, & Larsson, 2007), e diversos patógenos (Spillner *et al.*, 2012).

Segundo Woolley e Landon (1995) a injeção de antígenos por via intramuscular resulta em altos níveis de anticorpos IgY específicos após 28 dias da imunização. Nossas análises de produção de IgY anti-*A. baumannii* e IgY anti-*P. aeruginosa* no soro de galinhas poedeiras inoculadas *A. baumannii* e *P. aeruginosa* MR mostraram que uma semana após a primeira imunização houve um aumento dos níveis de IgY, o qual atingiu seu pico após 35 dias.

Os resultados da eletroforese mostraram o perfil das proteínas extraídas da gema do ovo de galinhas poedeiras imunizadas com *A. baumannii* produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e VIM-2, foi possível observar a presença de moléculas de massa molecular de aproximadamente 65 kDa e 23 kDa, referentes a massa molecular da cadeia pesada e cadeia leve dos anticorpos IgY, respectivamente. Esse achado do presente estudo está de acordo com outros

trabalhos que obtiveram o mesmo perfil proteico apresentando moléculas correspondendo a cadeia pesada e leve da IgY (Guimarães *et al.*, 2009; Li, Lu, Li, & Chen, 2014; Sampaio *et al.*, 2014).

Sugita-Konishi *et al.* (1996) demonstraram em um estudo *in vitro* que anticorpo IgY específico nas concentrações de 10 mg/ml e 5 mg/ml foi capaz de inibir significamente o crescimento de *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram que concentrações de 5 mg/ml IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23 e *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e VIM-2 promovem a inibição do crescimento bacteriano de *A. baumannii* produtora de OXA 23 e *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e VIM-2, respectivamente. Zhen *et al.* (2008) observou que 5mg/ml IgY específico inibiu o crescimento de *E.coli* com resultado semelhante ao verificado em nosso estudo.

Xu *et al.* (2012) demonstraram que foi necessário 20 mg/ml de IgY específica para inibir o crescimento de *F. nucleatum*, responsável por infecções bucais. Enquanto que para inibição *L. Monocytogenes*, bactéria que provoca contaminação alimentar, foi necessário uma concentração de 200 mg/ml de IgY anti *L. monocytogenes* para observar uma inibição relevante (Sui, Cao, & Lin, 2011).

Vários estudos tem discutido uma possível explicação para esse efeito inibitório da IgY. Tsubokura *et al.* (1997) propuseram que as alterações observadas no crescimento bacteriano por resultado de tratamento com IgY deve-se a aglutinação bacteriana, essa aglutinação tornam as bactérias menos móveis e conseqüentemente dificulta a captação de nutrientes. No entanto, outro estudo sugere que a reação de aglutinação não está relacionada à diminuição do crescimento bacteriano, pois observaram uma atividade antimicrobiana do IgY em meio sólido, onde as bactérias não podem agregar-se (Sunwoo, Lee, Menninen, Suresh, & Shin, 2002).

Outras explicações para o efeito inibitório da IgY pode ser devido ao fato da IgY ligar-se a estruturas funcionais e a fatores de virulência, essenciais para a sobrevivência e colonização de bacterias Gram negativas. Chalghoumi *et al* (2009) imunizaram galinhas com porinas de membrana externa (OMP) de *Salmonella* spp. e verificou que um efeito inibitório de IgY anti-*Salmonella* sobre o crescimento de *Salmonella* spp, atribuindo essa inibição a ligação da IgY a porina, essa interação pode levar ao comprometimento das funções biológicas das porinas, interrompendo

a passagem de nutrientes e outras substâncias essenciais para a sobrevivência e manutenção da virulência bacteriana.

A proteína de membrana externa OpF de *P. aeruginosa* foi submetida a mapeamento de epítomos, e provou ser uma boa candidata para uma vacina, e também como alvo de anticorpos monoclonais de aplicação terapêutica (Gavinho, 2011). Estudo mostrou que o soro imune de pessoas vacinadas com as proteínas de membrana OprF-OprI foi capaz de reconhecer OprI (6KDa) e OprF (33KDa) (Baumann, Mansouri, & Von Specht, 2004). Bonin (2011) relatou a estimativa do peso molecular de OMP extraídas da *A. baumannii*, que variam entre 84-21 kDa. O perfil de reconhecimento dos IgY específicos observado em nosso estudo, mostrou que IgY anti-*A. baumannii* reconheceu antígenos entre 82–26 kDa, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 reconheceram antígenos entre 82–37 kDa e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 reconheceu antígenos entre 64-19 kDa.

Em conclusão, os nossos resultados demonstraram que anticorpos IgY policlonais, extraídos do ovo de galinhas poedeiras imunizadas com bactérias *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos, apresentam um efeito inibitório expressivo sobre o crescimento dessas bactérias de maneira dose dependente, mostrando que a IgY é uma potencial alternativa ao uso de antibióticos no tratamento de infecções por bacilos Gram negativos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida à ACNSF (número de concessão 1190232). Esse trabalho foi apoiado pela CAPES.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

## Referências

- Akita, E., & M., Nakai, S. (1992). Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science*, 57(3), 629-634.
- Ayraud-Thévenot, S., Huart, C., Minoz, O., Taoqui, M., Laland, C., Bousseau, A., & Castel, O. (2012). Control of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks in an intensive care unit: feasibility and economic impact of rapid unit closure. *The Journal of hospital infection*, 82(4), 290–292.
- Baumann, U., Mansouri, E., & Von Specht, B. U. (2004). Recombinant oprf-oprl as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Vaccine*, 22(7), 840-847.
- Bonin, R. F. (2011). *Identificação de proteínas imunogênicas para o desenvolvimento de estratégias, baseadas em imunoterapia, contra infecções por Acinetobacter spp.* Dissertação de mestrado, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Chalghoumi, R., Théwis, A., Beckers, Y., Marcq, C., Portetelle, D. & Schneider, Y. J. (2009). Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium *in vitro*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5), 593-604.
- Dai, Y. C., Zhang, X. F., Tan, M., Huang, P., Lei, W., Fang, H.,... Jiang, X. (2013). A dual chicken IgY against Rotavirus and Norovirus. *Antiviral Research*, 97(3), 293–300.
- El Solh, A. A., & Alhajhusain, A. (2009). Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 229-238.
- Falagas, M. E., & Kopterides, P. (2006). Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *The Journal of Hospital Infection*, 64(1), 7–15.
- Figueiredo, D. Q., Castro, L. F. S., Santos, K, R. N., Teixeira, L. M., & Mondino, S. S. B. (2009). Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45(3), 177-184.
- Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S. & Sader, H. S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo  $\beta$ -lactamase. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 699-702.
- Gavinho, B. (2011). *Desenvolvimento de imunógeno bacteriano de Pseudomonas aeruginosa conjugado ao toxóide tetânico.* Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.
- Gill, M. M., Usman, J., Kaleem, F., Hassan, A., Khalid, A., Anjum, R., & Fahim, Q (2011). Frequency and antibiogram of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *JCPSP*, 21(9), 531–553.

- Gionco, B. (2012). *Estudo da epidemiologia molecular e ocorrência da produção de carbapenemases em Acinetobacter baumannii isolados do hospital Universitário de Londrina*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.
- Guimarães, M. C. C., Amaral, L. G., Rangel, L. B., Silva, I. V., Matta, C. G., & Matta, M. F. (2009). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 57(5), 377-382.
- Ibrahim, El-S. M., Rahman, A. K., Isoda, R., Umeda, K., Van Sa, N., & Kodama, Y. (2008). In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). *Vaccine*, 26(17), 2073–2080.
- Jahangiri A., Owlia, P., Rasooli, I., Salimian, J., Derakhshanifar, E., Naghipour Erami, A.,... Darvish Alipour Astaneh, S. (2019). Specific egg yolk antibodies (IgY) confer protection against *Acinetobacter baumannii* in a murine pneumonia model. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 624-632.
- Kamikawa, Y., Fujisaki, J., Nagayama, T., Kawasaki, K., Hirabayashi, D., Hamada, T., Sakamoto, R.... Sugihara, K. (2016). Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis. *Gerodontology*, 33(3), 342–347.
- Kollberg, H., Carlander, D., Olesen, H., Wejåker, P. E., Johannesson, M., & Larsson A. (2003). Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatric Pulmonology*, 35(6), 433–440.
- Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, J., & Roth, T. F. (1985). Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*, 54(4), 755–762.
- Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Park, D. W., Jang, S. I., Morales, A., García, D.,... Lillwhoj, E. P. (2009). Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Veterinary Parasitology*, 163(1-2), 123-126.
- Li, C. H., Lu, X. J., Li, D. F., & Chen, J. (2014). Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 37(1), 108–114.
- Masterton, R. G. (2009). The new treatment paradigm and the role of carbapenems. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(2), 105–110.
- Mendes, R. E., Castanheira, M., Garcia, P., Gusman, M., Toleman, M. A., Walsh, T. R., & Jones, R. N. (2004). First isolation of *bla<sub>vim-2</sub>* in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4), 1433-1434.
- Narat, M. (2003). Production of antibodies in chickens. *Food Technol Biotechnol*, 41(3), 259–267.

- Nguyen, H. H., Tumpey, T. M., Park, H. J., Byun, Y. H., Tran, L. D., Nguyen, V. D.,... Nguyen, C. V. (2010). Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against Influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PLoS One*, 5(4), e10152.
- Nilsson, E., Amini, A. Wretliind, B., & Larsson A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *Journal of chromatography*, 856(1-2), 75–80.
- Rollier, C., Charollois, C., Jamard, C., Trepo, C., & Cova L. (2000). Maternally transferred antibodies from DNA-immunized avians protect offspring against Hepadnavirus infection. *Journal Virology*, 74, 4908-4911.
- Sampaio, L. C. L., Baldissera, M. D., Grando, T. H., Gressler, L. T., Capeleto, D. M., Sa, M. F., ... Monteiro, S. G. (2014). Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 96-103.
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., & Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33(2):129-54.
- Shin, J. H., Yang, M., Nam, S. W., Kim, J. T., Myung, N. H., Bang, W. G., & Roe, I. H. (2002). Use of egg yolk derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 1061–1066.
- Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., & Plessis, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, 40(5), 313–322.
- Sui, J., Cao, L., & Lin, H. (2011). Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 1946–1950.
- Sugita-Konishi Y., Shibata K., Yun S.S., Hara-Kudo Y., Yamaguchi K., & Kumagai S. (1996). Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60(5), 886 -888.
- Sunwoo, H. H., Lee, E. N., Menninen, K., Suresh, M. R., & Shin, J.S. (2002). Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science* 67(4), 1486–1494.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M., & Hammarström L. (1997). Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni* infected chickens. *Clinical and Experimental Immunology* 108(3), 451–455.
- Vega, C. G., Bok, M., Vlasova, A. N., Chattha, K. S., Fernández, F. M., Wigdorovitz, A.,... Saif, L. J. (2012). IgY antibodies protect against human rotavirus induced

- diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *PLoS One* 7(8), e42788.
- Vasoo, S., Barreto, J. N., & Tosh, P. K. (2015). Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clinic Proceedings* 90(3), 395–403.
- Xu, F. X., Xu, Y. P., Jin, L. J., Liu, H., Wang, L. H., You, J. S.,... Li, X. Y. (2012). Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against periodontal disease-causing *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Applied Microbiology* 113(4), 983–991.
- Wallach, M. G., Webby, R. J., Islam, F., Walkden-Brown, S., Emmoth, E., Feinstein, R., & Gronvik, K. O. (2011). Cross-protection of chicken immunoglobulin Y antibodies against H5N1 and H1N1 viruses passively administered in mice. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 18(7), 1083–1090.
- Wang, B., Yang, J., Cao, S., Wang, H., Pan, X., Zhu, J.,... Li, M. (2014). Preparation of specific anti-*Helicobacter pylori* yolk antibodies and their antibacterial effects. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(10), 6430–6437.
- Woolley, J. A., & Landon, J. (1995) Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *Journal of Immunological Methods* 178(2), 253–265.
- Zhen, Y. H., Jin, L. J., Guo, J, Li, X. Y., Lu, Y. N., Chen, J., & Xu, Y. P. (2008). Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 130(1-2), 126–133.

**Tabela 1-** Caracterização dos isolados clínicos produtores de Carbapenemases

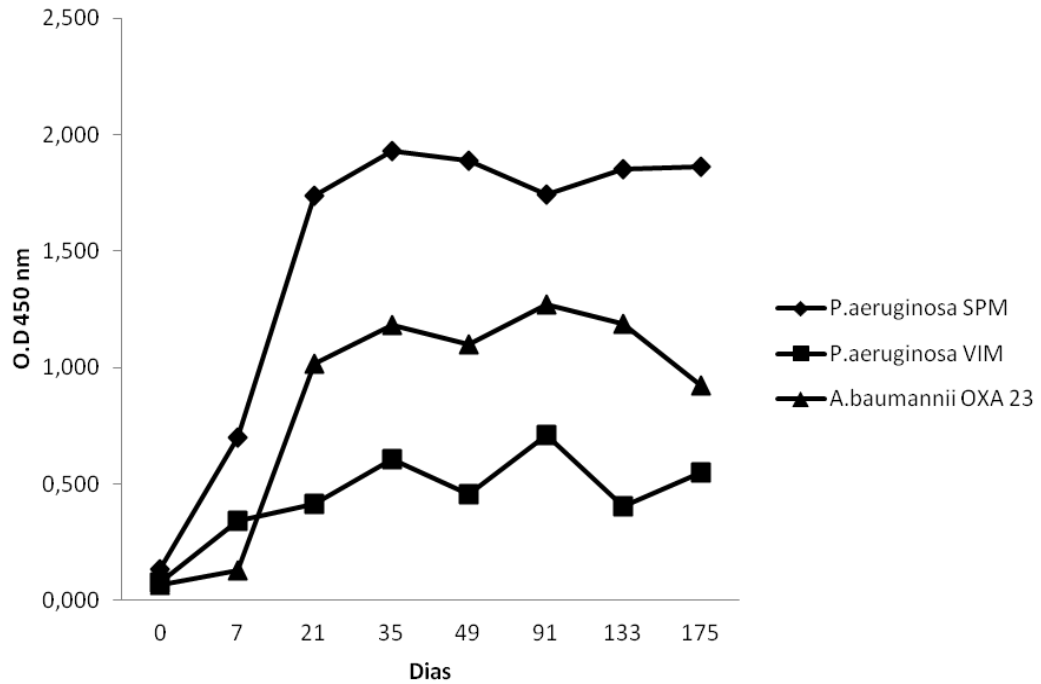
Isolado clínico	Gene codificador de MBL	Cepa	Referência
<i>A. baumannii</i>	<i>bla<sub>oxa-23</sub></i>	Ab 31	Gionco et al, 2012
<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla<sub>spm-1</sub></i>	Pa 1088	Gales et al, 2003
<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla<sub>vim-2</sub></i>	Pa 23	Mendes et al, 2004

**Tabela 2** - Unidade de ELISA dos anticorpos extraídos da gema após a 5ª imunização. Densidade óptica (D.O) a partir de 0,2.

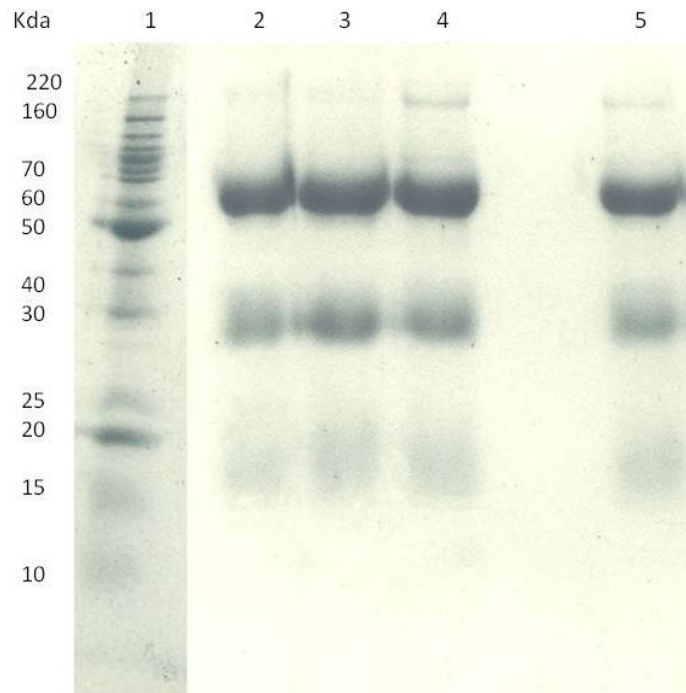
Anticorpos IgY	Unidade de ELISA (ug/ml)
IgY anti- <i>A. baumannii</i> OXA-23	0,21
IgY anti- <i>P. aeruginosa</i> SPM-1	0,12
IgY anti- <i>P. aeruginosa</i> VIM-2	0,19

**Tabela 3-** Unidade de ELISA dos anticorpos extraídos da gema após a 7ª imunização. Densidade óptica (D.O) a partir de 0,2.

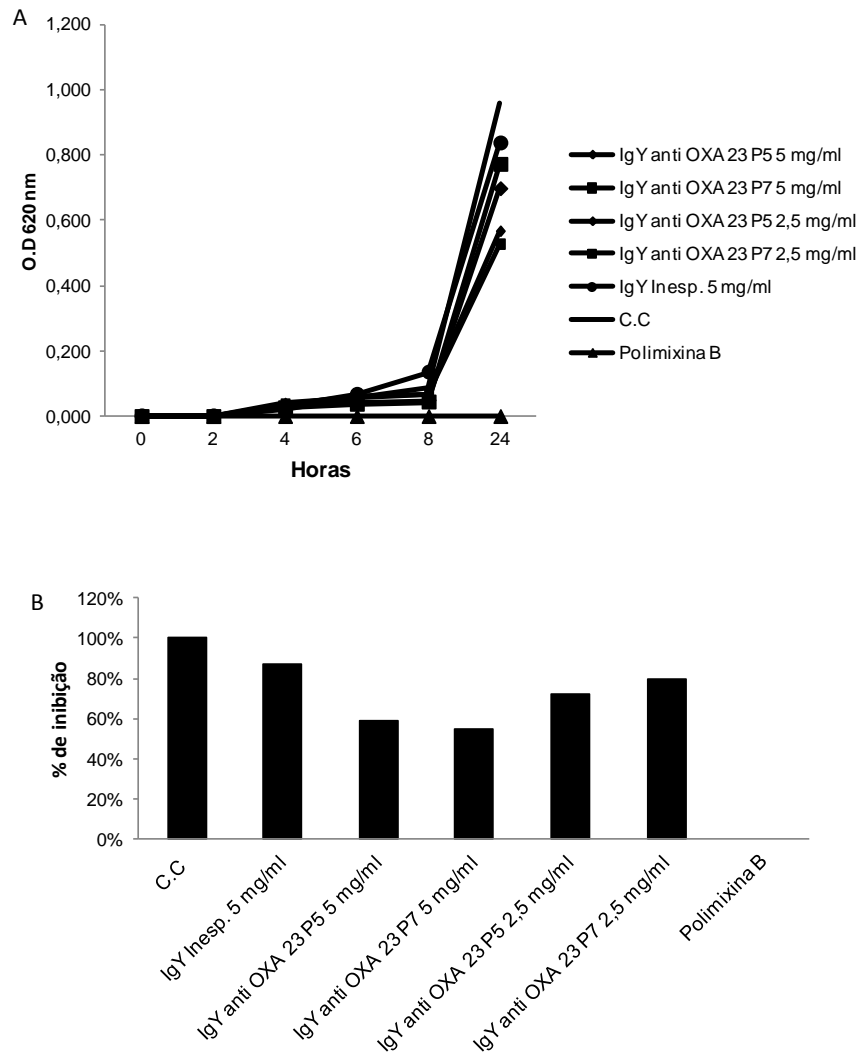
Anticorpos IgY	Unidade de ELISA (ug/ml)
IgY anti- <i>A. baumannii</i> OXA-23	0,25
IgY anti- <i>P. aeruginosa</i> SPM-1	0,14
IgY anti- <i>P. aeruginosa</i> VIM-2	0,14



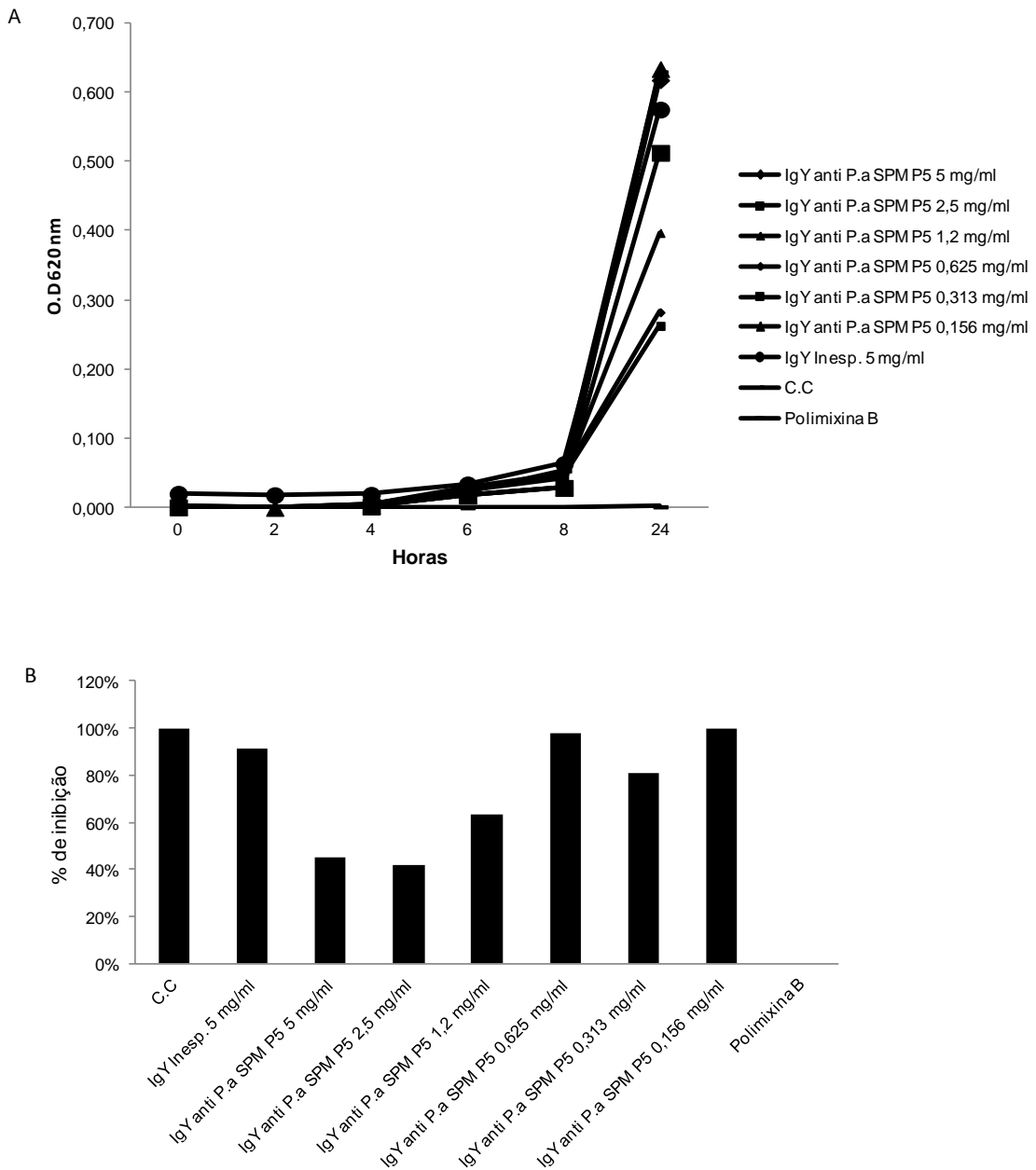
**Figura 1-** Níveis de anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 presentes no soro de galinhas poedeiras imunizadas com *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistente aos antimicrobianos. O soro dos animais foi diluído 1:500 em PBS leite 1% e o nível de anticorpos IgY foram determinados por ELISA indireto e a leitura das densidades ópticas foi realizada em um comprimento de onda de 450nm.



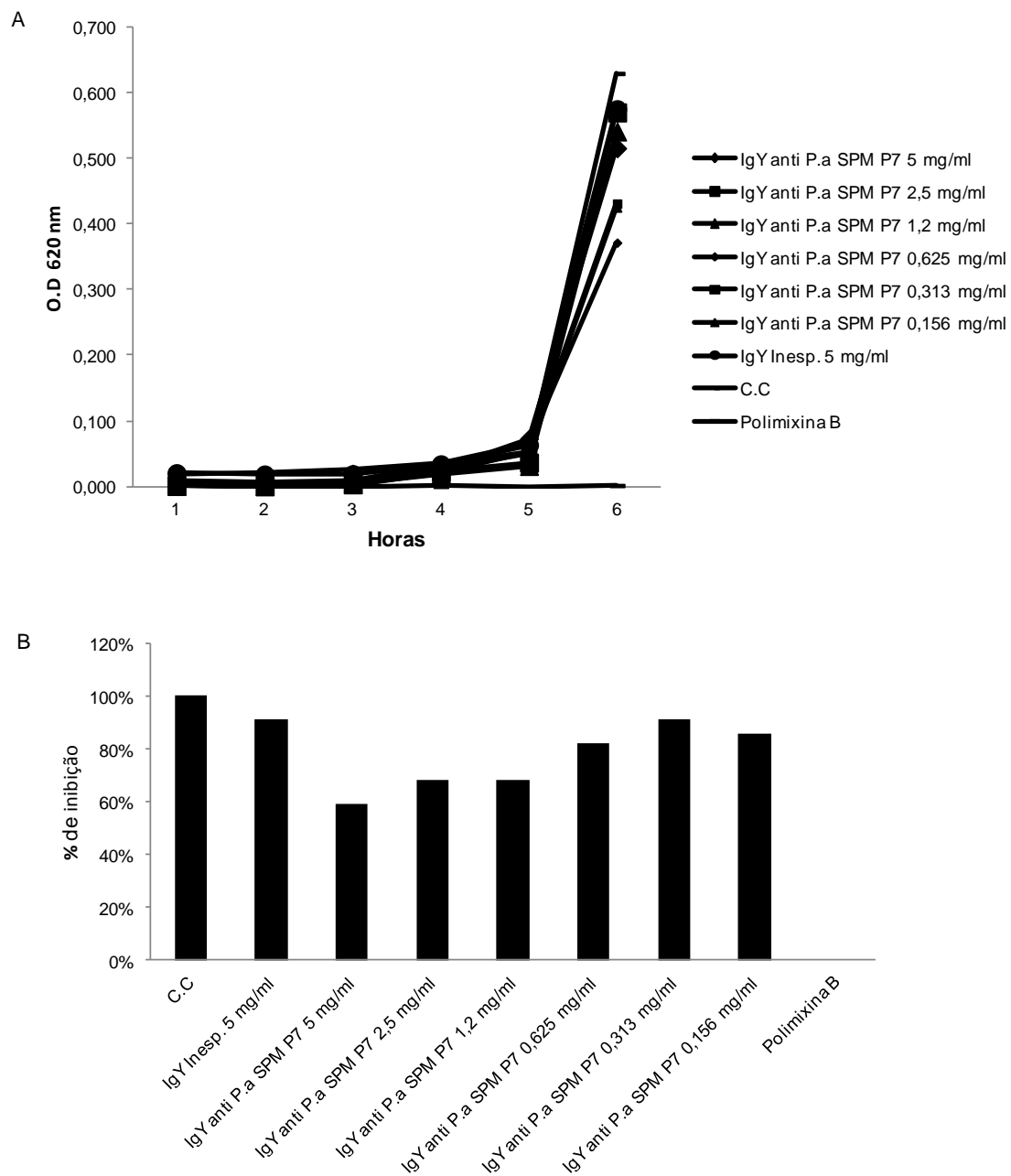
**Figura 2 - Perfil eletroforético do anticorpo IgY extraído da gema do ovo de galinhas imunizadas com bactérias multirresistentes aos antimicrobianos.** Coluna 1: Marcador de Massa Molecular (Bench mark <sup>TM</sup> Protein ladder, 10747-012, Invitrogen); coluna 2 a 5 5 µg de IgY anti- *P.aeruginosa* produtora de SPM-1, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2; IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23; e IgY inespecífico, respectivamente. Análise da pureza do IgY através de eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, em condições redutoras, corado com Comassie Blue (Vetec Química Fina).



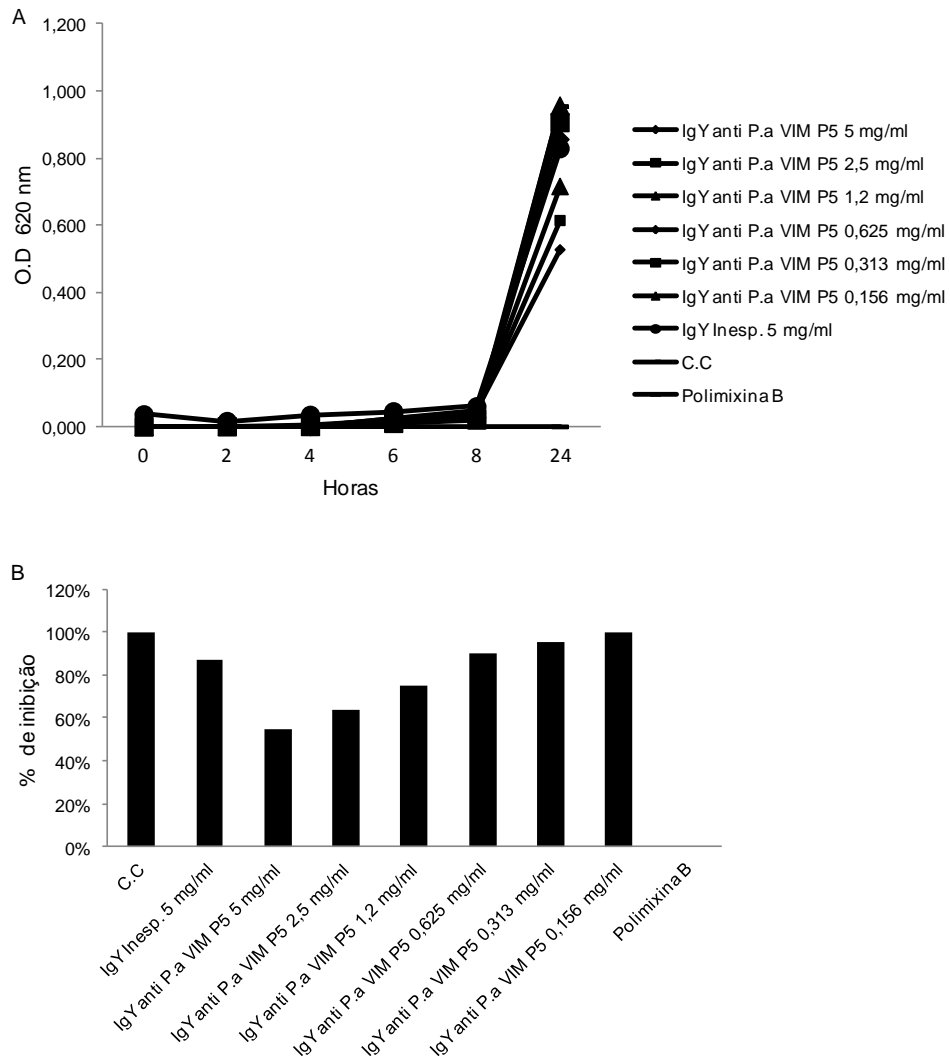
**Figura 3 - Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *A. baumannii* produtora de OXA-23 após a 5ª e 7ª imunização.** A) Curva de crescimento e morte de *A. baumannii* produtora de OXA-23 tratadas com 0 (controle de crescimento) 5, 2,5 mg/ml de IgY específico, 5 mg/ml de IgY inespecífico (controle negativo) ou com 2µg/ml de Polimixina B (controle positivo) B) Porcentagem de inibição do crescimento de *A. baumannii* produtores de OXA 23 em 24 horas do experimento.



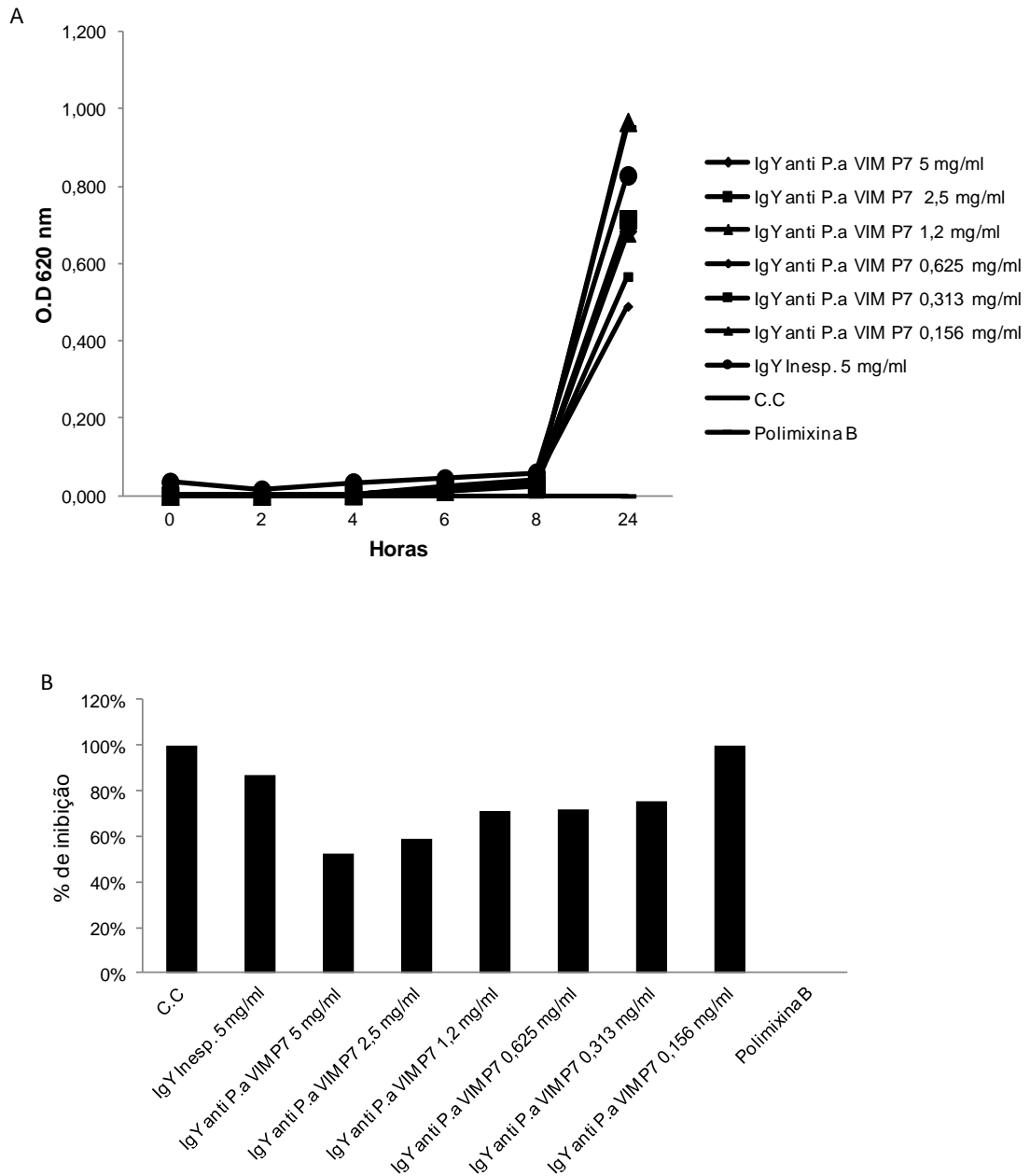
**Figura 4 - Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 após a 5ª imunização. A) Curva de crescimento e morte de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 tratadas com 0 (controle de crescimento) 5 a 0,156 mg/ml de IgY específico, 5 mg/ml de IgY inespecífico (controle negativo) ou com 2µg/ml de Polimixina B (controle positivo) B) Porcentagem de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 em 24 horas do experimento.**



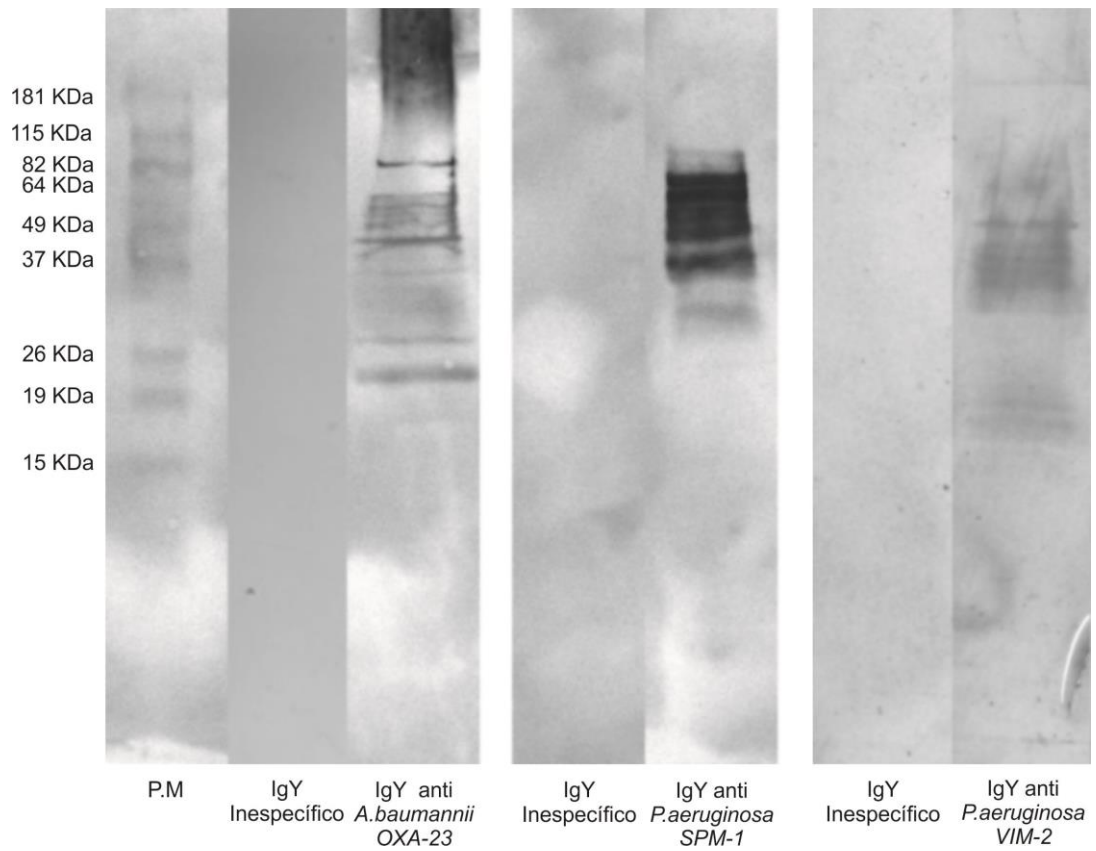
**Figura 5 - Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 após a 7ª imunização. A) Curva de crescimento e morte de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 tratadas com 0 (controle de crescimento) 5 a 0,156 mg/ml de IgY específico, 5 mg/ml de IgY inespecífico (controle negativo) ou com 2µg/ml de Polimixina B (controle positivo) B) Porcentagem de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 em 24 horas do experimento.**



**Figura 6 - Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 após a 5ª imunização. A) Curva de crescimento e morte de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 tratadas com 0 (controle de crescimento) 5 a 0,156 mg/ml de IgY específico, 5 mg/ml de IgY inespecífico (controle negativo) ou com 2µg/ml de Polimixina B (controle positivo) B) Porcentagem de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 em 24 horas do experimento.**



**Figura 7 - Efeito inibitório do anticorpo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 extraídos da gema de galinhas poedeiras imunizadas com *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 após a 7<sup>a</sup> imunização. A) Curva de crescimento e morte de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 tratadas com 0 (controle de crescimento) 5 a 0,156 mg/ml de IgY específico, 5 mg/ml de IgY inespecífico (controle negativo) ou com 2µg/ml de Polimixina B (controle positivo) B) Porcentagem de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 em 24 horas do experimento.**



**Figura 8 - Reconhecimento de antígenos bacterianos de *A. baumannii* produtora de OXA-23, *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 por anticorpos IgY específicos e inespecíficos, extraídos da gema do ovo de galinhas poedeiras. Para análise do perfil de reconhecimento de antígenos bacterianos por IgY específicos e inespecíficos, foi realizado *western blotting*, com 500µg/ml de IgY diluídos em PBS leite 1%.**

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

Com os resultados obtidos em nosso trabalho conclui-se que:

- A imunização de galinhas poedeiras com inóculo bacteriano de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* portadoras do gene de resistência *bla<sub>oxa-23</sub>*, *bla<sub>spm-1</sub>* e *bla<sub>vim-2</sub>*, resultou em altos níveis séricos de IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2.
- Anticorpos IgY extraído da gema de galinhas imunizadas, demonstraram um efeito inibitório, dose dependente, sobre o crescimento de *A. baumannii* produtora de OXA-23, *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e *P. aeruginosa* produtora de VIM-2, já os anticorpos IgY inespecíficos não apresentaram um efeito inibitório expressivo.
- Anticorpos IgY anti-*A. baumannii* produtora de OXA-23, anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 extraídos da gema reconheceram com maior intensidade o antígeno bacteriano *A. baumannii* e *P. aeruginosa* portadoras dos genes de resistência *bla<sub>oxa-23</sub>*, *bla<sub>spm-1</sub>* e *bla<sub>vim-2</sub>*, respectivamente, enquanto o anticorpo IgY inespecífico não reconheceu nenhum antígeno bacteriano.