



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MIRIELE CAROLINE DA SILVA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-
NUCLEOPROTEÍNA PARA DETECÇÃO DO VÍRUS
INFLUENZA A EM SUÍNOS**

Londrina
2018

MIRIELE CAROLINE DA SILVA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-
NUCLEOPROTEÍNA PARA DETECÇÃO DO VÍRUS
INFLUENZA A EM SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2018

MIRIELE CAROLINE DA SILVA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS IGY ANTI-
NUCLEOPROTEÍNA PARA DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A EM
SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mário Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eduardo Vignoto Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Wagner Loyola
Empresa Brasileira de Pesquisa - EMBRAPA

Londrina, 25 de abril de 2018.

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

da Silva, Miriele Caroline.

Produção e aplicação de anticorpos IgY anti-nucleoproteína para detecção do vírus influenza A em suínos / Miriele Caroline da Silva. - Londrina, 2018.
51 f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Anticorpos - Tese. 2. IgY - Tese. 3. Diagnóstico - Tese. 4. Influenza suína - Tese. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde, por guiar os meus passos e por permitir que eu chegasse até aqui.

À toda a minha família. À minha mãe, por sua compreensão e paciência comigo durante esses anos, e por tudo que tem feito por mim. À minha irmã Franciele, minhas sobrinhas Melissa, Milena e Maria Helena e ao Gabriel pelo amor e pelo carinho. Ao meu esposo Jonathas pelo apoio, amor, carinho, incentivo, compreensão e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson José Venancio, pela oportunidade e por tudo que me ensinou.

Às pesquisadoras da EMBRAPA Suínos e Aves, Dr^a. Rejane Schaefer por sua colaboração e pela oportunidade de aprender novas técnicas; Dr^a. Danielle Gava por todo apoio tanto para escrever o artigo quanto nos testes realizados e Dr^a. Ana Paula Bastos pela ajuda no teste de imunohistoquímica.

À Francieli Ianiski e à Marisete F. Schiochet pela assistência laboratorial e à Marina Schmitt pelo design gráfico.

Ao Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr e à Dr^a. Carine Kunzler Souza por suas contribuições para escrever o artigo.

Ao Prof. Dr. Mário Augusto Ono, à Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano, ao Prof. Dr. Eduardo Vignoto Fernandes e ao Dr. Wagner Loyola pela participação na banca de defesa e por suas contribuições.

A todos os amigos do laboratório: Prof^a. Carla Cristiane da Silva, Kamila Damasco Falchetti, Flávia Ruzon, Aline Miquelin do Nascimento, Renata Sanches, Paola Singi, Ana Claudia Poletto, Rosario Mamani Barri, Amanda Pitz, Eduardo Vignoto Fernandes, Márcio Scarone pela ajuda em várias etapas ao longo desses anos e pelos bons momentos que passamos juntos.

À CAPES pela bolsa concedida.

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

Silva, Miriele Caroline da. **Produção e aplicação de anticorpos IgY anti-nucleoproteína para detecção do vírus influenza A em suínos**. 2018. 50 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

RESUMO

Os anticorpos são importantes ferramentas em testes de diagnóstico. A utilização de anticorpos IgY apresenta diversas vantagens em relação aos anticorpos de mamíferos e vários estudos mostram sua aplicação em técnicas de imunodiagnóstico. Assim, esse trabalho teve como objetivo produzir anticorpos IgY anti-nucleoproteína do vírus influenza A (IAV) e avaliar sua aplicação na detecção do vírus IAV por imunocitoquímica (ICQ) e imunohistoquímica (IHC). Para tanto, galinhas poedeiras da linhagem White Leghorn foram inoculadas com 20 µg da nucleoproteína (NP) nos dias 1, 14, 28, 42, 84, 126 e 168 do experimento. Sete dias após a 3^a, 5^a e 7^a inoculação, os ovos foram coletados e os anticorpos IgY foram extraídos por precipitação com sulfato de amônio. Os títulos e a especificidade dos anticorpos purificados foram determinados por ELISA, *western blotting*, ICC e IHC. As galinhas poedeiras inoculadas com a proteína NP produziram altos níveis de anticorpos específicos anti-NP após a 7^a inoculação. Além disso, foi detectada uma coloração positiva em células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) infectadas com IAV e incubadas com anticorpo IgY anti-NP. No entanto, em tecidos pulmonares de suínos infectados não foi observada nenhuma coloração através do teste IHC. Os dados obtidos mostraram que os anticorpos IgY anti-NP purificados das gemas de ovos se ligam especificamente ao IAV, com o reconhecimento dos principais subtipos de vírus circulantes em suínos (H1N1, H1N2 e H3N2), reforçando sua utilidade no diagnóstico de IAV.

Palavras-chave: Imunoglobulina Y. Diagnóstico. Imunodeteção. Influenza suína.

Silva, Miriele Caroline da. **Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine.** 2018. 50 p. Thesis (Doctoral degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, 2018.

ABSTRACT

Antibodies are important tools in diagnostic tests. The use of IgY antibodies present several advantages over mammalian antibodies and studies show its application in immunodiagnostic techniques. Thus, this work aimed to produce anti-nucleoprotein IgY antibodies from the influenza A virus (IAV) and to evaluate its application in the detection of IAV virus by immunocytochemistry (ICQ) and immunohistochemistry (IHC). For the study, laying hens of the White Leghorn line were inoculated with 20 µg of the nucleoprotein (NP) on days 1, 14, 28, 42, 84, 126 and 168 of the experiment. Seven days after the 3rd, 5th, and 7th inoculation the eggs were collected and the IgY antibodies were extracted by precipitation with ammonium sulfate. The titers and specificity of the purified antibodies were determined by ELISA, western blotting, ICC and IHC. Laying hens inoculated with NP protein produced high levels of anti-NP specific antibodies after the 7th inoculation. In addition, a positive staining in IAV-infected MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells incubated with anti-NP IgY antibody was detected. However, no staining was observed in lung tissues from infected swine through the IHC test. The data obtained showed that anti-NP IgY antibodies purified from eggs yolks bound specifically to IAV, with the recognition of the main virus subtypes circulating in swine (H1N1, H1N2, and H3N2), reinforcing their usefulness in the diagnosis of IAV.

Key words: Immunglobulin Y. Diagnosis. Immunodetection. Swine influenza.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 -	Electrophoretic profile and IgY antibody recognition profile purified from egg yolk of hens inoculated with NP protein of IAV	47
Figure 2 -	Production of anti-NP IgY antibodies	48
Figure 3 -	Immunocytochemistry test for detection of influenza A virus in infected MDCK cells	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC	<i>3-amino-9-ethyl-carbazole</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
HA	Hemaglutinina
HI	Inibição da hemaglutinação
IAV	<i>Influenza A Virus</i>
ICC	<i>Immunocytochemistry</i>
ICQ	Imunocitoquímica
IF	Imunofluorescência
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IHQ	Imunohistoquímica
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
mRNA	RNA mensageiro
NA	Neuraminidase
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural 1
NS 2	Proteína de exportação nuclear
PA	Polimerase ácida
PB 1	Polimerase básica 1
PB 2	Polimerase básica 2
RPN	Ribonucleoproteína
RNA	Ácido ribonucleico
RT	<i>Room Temperature</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase
SPF	<i>Specific pathogen free</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ANTICORPOS IGY.....	10
1.2	SUÍNOS X INFLUENZA A.....	13
1.3	CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A	15
	REFERÊNCIAS	22
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	ARTIGO: Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine	29
3.1	Introduction	31
3.2	Materials and methods	32
3.2.1	<i>Production of NP antigen for immunization of laying hens</i>	32
3.2.2	<i>Animals</i>	32
3.2.3	<i>Inoculation of animals</i>	33
3.2.4	<i>Purification of IgY antibodies from egg yolk</i>	33
3.2.5	<i>Immunochemical characterization of IgY antibodies by Western Blotting</i>	34
3.2.6	<i>Determination of antibody reactivity</i>	34
3.2.7	<i>Immunocytochemistry (ICC) test for the detection of influenza A virus in infected cells</i>	35
3.2.8	<i>Immunohistochemistry (IHC) test for the detection of influenza A virus in infected tissues</i>	36
3.3	Results	37
3.3.1	<i>Production of anti-NP IgY antibodies</i>	37
3.3.2	<i>Immunochemical characterization of IgY antibodies by Western Blotting</i>	37

3.3.3	<i>Determination of antibody reactivity</i>	38
3.3.4	<i>Immunocytochemistry</i>	38
3.3.5	<i>Immunohistochemistry</i>	38
3.4	Discussion	38
	References	42
4	CONCLUSÃO GERAL	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTICORPOS IgY

Os anticorpos são proteínas que se ligam especificamente a um antígeno (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005) e são produzidas em resposta a um imunógeno (DELAHAUT, 2017). Essas moléculas são amplamente utilizadas em diagnóstico e na pesquisa científica para detecção ou quantificação de antígenos e anticorpos específicos por diversas técnicas como imunodifusão, ELISA e *western blotting* (MUNHOZ et al., 2014). Geralmente, os anticorpos disponíveis para essas finalidades são anticorpos monoclonais ou policlonais produzidos em mamíferos (CHALGHOUMI et al., 2009; LEE et al., 2017; NARAT, 2003).

A produção de anticorpos normalmente requer o uso de animais como coelhos, ratos, cobaias, cavalos, ovelhas e cabras (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). A escolha da espécie animal depende de diversos fatores como: a quantidade de anticorpos necessária, a distância filogenética entre a fonte do antígeno e a espécie utilizada para produção de anticorpos, as condições para manutenção e manejo do animal, a especificidade do anticorpo (monoclonal ou policlonal), entre outros (DELAHAUT et al., 2017; LEE et al., 2017; LIPMAN et al., 2005). O procedimento envolve a imunização e sucessivas coletas de sangue ou mesmo a morte do animal para obtenção dos anticorpos, o que causa dor e sofrimento ao animal (CHALGHOUMI et al., 2009; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; NARAT, 2003).

Uma alternativa à produção de anticorpos em mamíferos é a produção em galinhas poedeiras. A inoculação de galinhas poedeiras com um antígeno leva à produção de anticorpos específicos que são transportados do sangue para a gema do ovo, assim a obtenção de anticorpos elimina a coleta de sangue trazendo benefícios em relação ao bem-estar animal (SCHADE et al., 1996). Além disso, uma galinha poedeira produz uma grande quantidade de anticorpos, sendo possível obter entre 1000-2800 mg de IgY por mês, enquanto de um coelho é obtido apenas cerca de 200 mg de IgG (em 40 mL de sangue) no mesmo período (SCHADE et al., 2005). Conseqüentemente, a extração de IgY a partir da gema de ovos pode ser uma forma econômica de obter grandes quantidades de anticorpos específicos (CARLANDER et al., 2002), uma vez que é necessário manter um menor

número de animais para essa finalidade (NARAT, 2003). Além disso, os custos para manutenção de galinhas geralmente são menores do que para manter outros animais de grande porte (SCHADE et al., 2005).

A estrutura geral da molécula de IgY consiste de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, com massa molecular total de 167 a 180 kDa (SCHADE et al., 2005; WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Cada cadeia pesada possui em torno de 65-70 kDa e cada cadeia leve entre 18-25 kDa (LESLIE; CLEM, 1969; NARAT, 2003; SCHADE et al., 2005). A IgY possui um domínio variável (V_H) e quatro domínios constantes (C_{H1} ; C_{H2} ; C_{H3} e C_{H4}) na cadeia pesada, enquanto que a IgG de mamíferos possui um domínio variável e três domínios constantes (C_{H1} ; C_{H2} e C_{H3}) (CHALGHOUMI et al., 2009). A presença de resíduos de prolina e glicina, entre os domínios C_{H1} - C_{H2} e C_{H2} - C_{H3} da cadeia pesada, conferem à IgY uma flexibilidade limitada em relação à IgG (CHALGHOUMI et al., 2009).

Assim como a IgG de mamíferos, a região Fab da IgY contém o sítio de ligação ao antígeno, enquanto a região Fc contém domínios responsáveis pela ativação do complemento, opsonização e sensibilização de mastócitos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Receptores para IgY, presentes nos folículos ovarianos das aves, captam esses anticorpos da circulação sanguínea materna e os transferem para a gema. A quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo e está relacionada com sua concentração no soro (CARLANDER; WILHELMSON; LARSSON, 2003; KOWALCZYK et al., 1985; MORRISON et al., 2001; SCHADE et al., 2005).

O processo para obtenção de IgY a partir da gema geralmente é eficiente e econômico. Inicialmente a gema e a clara são separadas e, em seguida é realizada a purificação dos anticorpos presentes na gema removendo lípidos e outras moléculas (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). Os métodos para purificação podem ser divididos em três grupos principais: métodos por precipitação, métodos cromatográficos e ultrafiltração (SCHADE et al., 2005). A seleção do método adequado depende do rendimento e pureza desejados, custo, tecnologia, habilidades de trabalho e escala de extração (MUNHOZ et al., 2014), sendo que a pureza dos anticorpos pode ser aumentada pela combinação de duas ou mais técnicas (SCHADE et al., 2005).

A IgY pode ser armazenada à 4°C por até 10 anos sem

comprometimento da sua atividade. Ainda se mantém estável à temperatura ambiente por até 6 meses e à 37°C por um mês (LARSSON et al., 1993). Sua atividade biológica é estável até 60°C, e acima de 70°C durante 30 minutos apenas 50% da sua atividade é mantida (HATTA et al., 1993). A estabilidade da IgY é comprometida em condições altamente ácidas ou alcalinas, mantendo sua atividade ótima em pH entre 4-12 (HATTA et al., 1993; LEE et al., 2002; SHIMIZU; FITZSIMMONS; NAKAI, 1988). Porém, a adição de açúcares como sucrose, trealose, lactose ou polióis como o sorbitol, pode aumentar a sua estabilidade em diferentes condições (JARADAT; MARQUARDT, 2000; LEE et al., 2002).

Uma grande vantagem do uso de IgY em mamíferos é que estes anticorpos não reagem de forma cruzada com receptores Fc, fator reumatóide e tampouco ativam o sistema complemento. Desta forma, sua utilização em testes de diagnósticos reduz a ocorrência de resultados falso-positivos (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). Tem sido observado em vários estudos o emprego de anticorpos IgY para a detecção de vírus, bactérias, parasitas e toxinas em amostras de seres humanos, animais e alimentos (CAI et al., 2012; LI et al., 2017; NAGARAJ et al., 2016; PARMA et al., 2012; SANIEE et al., 2013; SERT; KOC; KILINC, 2017).

Além disso, a imunoterapia empregando anticorpos IgY também vem sendo amplamente estudada, tanto em animais como em humanos. Diversos estudos mostram o uso de IgY contra vários patógenos, podendo ser aplicado como medida profilática e no tratamento de infecções, onde tem se tornado uma alternativa interessante no controle de microrganismos resistentes a antibióticos (CHALGHOUMI et al., 2009; SCHADE et al., 2005).

1.2 SUÍNOS X INFLUENZA A

A suinocultura industrial nacional é responsável pela geração de cerca de 1 milhão de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2017). O Brasil é um dos maiores produtores de suínos no mundo, ocupando o 4º lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína. Em 2016, a produção no país foi de 3,731 milhões de toneladas, onde 80,4% foi destinado ao mercado interno e 19,6% destinado à exportação (ABPA, 2017).

Os sistemas atuais de criação de suínos implicam no confinamento, onde os animais são mantidos em altas densidades, o que proporciona condições ideais para a disseminação de patógenos. As infecções respiratórias em suínos resultam em perdas significativas, sendo uma limitação na suinocultura (OPRIESSNIG; GIMÉNEZ-LIROLA; HALBUR, 2011). Os prejuízos econômicos devido a infecções por influenza são substanciais e um problema global, classificando-se entre os três maiores desafios na indústria de carne suína (VINCENT et al., 2017).

A influenza é uma doença respiratória aguda causada pela infecção do trato respiratório do hospedeiro pelo vírus influenza (ZHENG et al., 2015). De acordo com as características antigênicas das proteínas internas (nucleoproteína e proteína de matriz) os vírus influenza podem ser diferenciados em A, B e C (COX; BROKSTAD; OGRA, 2004). Diversos animais como suínos, equinos, humanos, mamíferos marinhos e aves podem ser infectados pelo vírus influenza A (IVA) (BROWN, 2000), enquanto os vírus influenza B e C infectam predominantemente seres humanos (COX; BROKSTAD; OGRA, 2004).

Em suínos o IAV causa uma infecção aguda altamente contagiosa, onde os vírus H1N1, H1N2 e H3N2 são os principais subtipos circulantes na população de suínos em todo o mundo (LEWIS et al., 2016; VAN REETH; MA, 2013). A doença é economicamente importante uma vez que traz prejuízos para a produção de suínos devido ao aumento dos custos de produção, com redução do desempenho dos animais afetados e gastos com antimicrobianos para o controle de infecções secundárias (BROWN, 2013).

Os surtos de gripe em suínos são caracterizados por febre, opacidade, perda de apetite, dificuldade respiratória e tosse. A mortalidade é baixa e a recuperação geralmente é rápida, entre 7-10 dias (VAN REETH, 2007). Porém,

animais em fase de terminação podem apresentar redução no desenvolvimento e perda de peso, enquanto fêmeas podem apresentar problemas reprodutivos devido à hipotermia (VAN REETH; MA, 2013). O IAV ainda pode contribuir para doenças respiratórias multifatoriais como o complexo de doença respiratória suína, uma síndrome resultante da co-infecção por dois ou mais patógenos respiratórios (VAN REETH; MA, 2013; VINCENT et al., 2017).

Além disso, a influenza suína é uma ameaça à saúde pública uma vez que o IVA pode ser transmitido a seres humanos, sendo considerada uma zoonose (RAJÃO et al., 2014; VINCENT et al., 2014). Os suínos são suscetíveis à infecção tanto por vírus aviários como por vírus de origem humana. Neste caso, os suínos atuam como hospedeiros intermediários para a adaptação de vírus de origem aviária em humanos (BOURRET et al., 2017). Portanto, a influenza suína pode representar riscos para a saúde pública, pela possibilidade de surgimento de vírus em suínos com potencial pandêmico, como observado em 2009 com a emergência em seres humanos de um vírus do subtipo H1N1 de origem suína (RAJÃO et al., 2014; VINCENT et al., 2014).

Os vírus influenza estão entre as causas mais comuns de infecções respiratórias em humanos (TAUBENBERGER; KASH, 2010). Estima-se que aproximadamente 500 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus influenza anualmente no mundo todo, dos quais 250 a 500 mil vão a óbito (ARIAS et al., 2009). A infecção em humanos é caracterizada por febre, calafrios, dor de cabeça, mal-estar e mialgia, seguidos por sintomas proeminentes do trato respiratório superior, como rinorréia, tosse, dor de garganta e inflamação (KUMAR et al., 2018). Os indivíduos geralmente se recuperam após alguns dias, mas a infecção pode causar complicações e até levar à morte devido a infecções secundárias ou co-infecções (JOSEPH et al., 2013).

As infecções associadas a casos de influenza são umas das principais causas de morbidade severa e mortalidade, especialmente em grupos de alto risco como idosos, crianças, gestantes e portadores de doenças crônicas (JOSEPH et al., 2013; MOGHADAMI, 2017). Assim, um rápido diagnóstico é essencial para o tratamento com medicamentos antivirais a fim de minimizar a propagação do vírus e evitar que os pacientes desenvolvam complicações (CHAUHAN et al., 2012). A doença ainda apresenta um grande impacto socioeconômico, onde pacientes podem necessitar de internação e tratamento

hospitalar, além de muitos indivíduos terem a produtividade no trabalho comprometida (MOGHADAMI, 2017).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* (BOUVIER; PALESE, 2008) e apresentam formas esféricas ou filamentosas (MOGHADAMI, 2017), possuindo entre 80 a 120 nm de diâmetro (ALEXANDER; BROWN, 2000). A superfície da partícula viral consiste de um envelope lipídico que contém predominantemente as glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), e em menor quantidade a proteína M2 (FORREST; WEBSTER, 2010). No interior do envelope há a proteína de matriz (M1) (GUARNER et al., 2000).

O genoma do vírus influenza consiste de oito segmentos de RNA (ácido ribonucleico) de fita simples sentido negativo (HAMPSON; MACKENZIE, 2006; WEBSTER et al., 2010). Cada segmento do RNA viral é encapsulado pela nucleoproteína (NP). O RNA é recoberto por várias unidades da proteína NP e junto existem três proteínas polimerases: polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2) e a polimerase ácida (PA) (TAUBENBERGER; KASH, 2010), formando a ribonucleoproteína (RPN) a qual possui estrutura helicoidal (FORREST; WEBSTER, 2010).

Os oito segmentos de RNA do vírus influenza codificam 10 proteínas, sendo a PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, proteína não estrutura 1 (NS1) e proteína de exportação nuclear (NS2). As três polimerases (PB1, PB2 e PA) são codificadas pelos segmentos 2, 1 e 3 respectivamente (WEBSTER, 1992). Essas proteínas estão envolvidas na transcrição e replicação (PAYUNGPORN et al., 2010). A PB2 atua na síntese do RNA mensageiro (mRNA) (TAUBENBERGER; KASH, 2010), enquanto a PB1 é responsável pelo alongamento do RNA viral e possui atividade RNA polimerase RNA-dependente (WEBSTER, 1992; TAUBENBERGER; KASH, 2010). A PA é importante para o funcionamento do complexo polimerase atuando na clivagem endonucleolítica de RNAs do hospedeiro (TAUBENBERGER; KASH, 2010).

A HA é uma proteína integral de membrana, sendo codificada pelo segmento 4 do RNA viral (WEBSTER, 1992). Tem como função a ligação da partícula viral à célula do hospedeiro e subsequente fusão do envelope com a

membrana celular, liberando o genoma viral na célula-alvo (FORREST; WEBSTER, 2010). A capacidade de ligação ao receptor é específica e dependente do tipo de ácido siálico (SA) do hospedeiro (PAYUNGPORN et al., 2010).

A NA, codificada pelo segmento 6, também é uma proteína integral de membrana e é o segundo principal antígeno presente na superfície viral (WEBSTER, 1992). Atua como enzima e é essencial para sobrevivência e patogenicidade do vírus, clivando resíduos de SA e permitindo a liberação de novos vírus que podem infectar novas células-alvo (PAYUNGPORN et al., 2010; TAUBENBERGER; KASH, 2010).

O segmento 5 codifica a NP (PORTELA; DIGARD, 2002), a qual encapsula o RNA viral e junto com o complexo polimerase formam a RNP. A NP contribui com a estabilização do genoma viral e a regulação da transcrição (PAYUNGPORN et al., 2010), e também atua no transporte de RNPs entre o citoplasma e o núcleo (TAUBENBERGER; KASH, 2010).

As proteínas M1 e M2 são codificadas pelo segmento 7 (WEBSTER, 1992). Na parte interna do envelope lipídico encontra-se a proteína M1, a qual interage com domínios citoplasmáticos das glicoproteínas de superfície e também com a RNP (TAUBENBERGER; KASH, 2010). Possui importante papel estrutural, fornecendo rigidez à partícula viral, e atua no processo de morfogênese. A proteína M2 é uma proteína integral de membrana, encontrada como um tetrâmero, a qual forma um canal iônico que permite a entrada ou saída de íons H^+ para regular o pH no interior da partícula viral (FLORES et al., 2007). O influxo de prótons cria um ambiente ácido dentro do vírus e faz com que o envelope viral sofra uma mudança conformacional. A subsequente remoção do revestimento do vírus libera o genoma e as proteínas virais no citoplasma das células infectadas (PAYUNGPORN et al., 2010).

As proteínas não estruturais NS1 e NS2 são codificadas pelo segmento 8 (WEBSTER et al., 1992). A NS1 não faz parte das partículas virais, sendo encontrada apenas nas células infectadas. Atua na regulação da expressão gênica viral, como *splicing* e tradução de RNA, e desempenha um papel significativo na supressão da resposta anti-viral do hospedeiro (PAYUNGPORN et al., 2010). A proteína NS2 é encontrada nos vírions e facilita a exportação nuclear de complexos RNPs virais (TAUBENBERGER; KASH, 2010).

Outra pequena proteína viral, a PB1-F2, é variavelmente codificada dentro do gene PB1 por um quadro de leitura alternativo. Tem como alvo a membrana interna mitocondrial e pode desempenhar um papel na apoptose durante a infecção por IAV (TAUBENBERGER; KASH, 2010).

A infecção pelo vírus influenza ocorre através do reconhecimento do AS, presente na célula hospedeira, mediado pela HA (BOUVIER; PALESE, 2008). O AS encontrado em células aviárias possui ligações α -2,3 e vírus adaptados para aves possuem HA com alta afinidade para esse tipo de ligação, enquanto vírus adaptados a humanos possuem a HA com especificidade para AS com ligações α -2,6, que é o tipo de ligação presente em células humanas. Suínos possuem ácido siálico com ambos os tipos de ligações (FLORES et al., 2007; TAUBENBERG; KASH, 2010), portanto são suscetíveis aos vírus de origem aviária e humana, desempenhando um importante papel na ecologia e na evolução do vírus influenza (CHOI; GOYAL; JOO, 2002).

Após a ligação ao AS o vírus é internalizado e o pH ácido endossomal leva à uma mudança conformacional na HA, mediando a fusão da membrana viral à membrana endossômica e permitindo a liberação de RNPs virais no citoplasma (TAUBENBERG; KASH, 2010). Uma única ligação entre HA e SA é de baixa afinidade, sendo necessárias várias ligações simultâneas para que o vírus possa entrar na célula hospedeira (FLORES et al., 2007).

A transcrição e a replicação do IAV ocorrem no núcleo da célula do hospedeiro, uma vez que o vírus depende da maquinaria da célula para o processamento de RNA (TAUBENBERGER; KASH, 2010). Uma vez liberado no citoplasma da célula hospedeira, as RNPs são transportadas até o núcleo celular e o complexo polimerase inicia a transcrição do mRNA (WEBSTER et al., 1992).

Os IAV são classificados em subtipos baseados nas propriedades antigênicas de suas proteínas de superfície HA e NA, que são importantes na indução da produção de anticorpos no hospedeiro. Atualmente tem sido identificados 18 subtipos de HA e 11 subtipos de NA circulantes na população de aves aquáticas e alguns mamíferos, dos quais 2 subtipos de HA e 2 de NA foram identificados recentemente em morcegos (TONG et al., 2012, 2013; WEBSTER; GOVORKOVA, 2014). Essas proteínas são altamente variáveis, enquanto as proteínas internas como a NP e a proteína M1 são mais conservadas entre os diferentes tipos de

influenza (VAN REETH, 2007), apresentando baixa taxa de mutação durante a evolução do vírus (ZHENG et al., 2015).

O genoma altamente segmentado permite alta variação dos IAV, o que é motivo de grande preocupação em saúde veterinária e saúde pública. Os mecanismos que levam à evolução do vírus influenza inclui mutação e reassortimento. O acúmulo de mutações pontuais no genoma viral, que ocorre durante a replicação, é denominado *antigenic drift* e é um processo contínuo que ocorre com todas as proteínas virais, porém é mais evidente nos sítios de ligação do anticorpo às glicoproteínas HA e NA (FORREST; WEBSTER, 2010). Assim, mutações onde ocorre a alteração de aminoácidos nas porções antigênicas da HA e NA apresentam vantagens para novas cepas virais que evadem da resposta imune do hospedeiro (TAUBENBERGER; KASH, 2010). Essa constante evolução dos vírus e sua capacidade de adaptação têm dificultado o desenvolvimento de vacinas de longa duração contra a infecção (BOUVIER; PALESE, 2008). A natureza segmentada do genoma viral favorece o mecanismo de reassortimento ou *antigenic shift*, a qual ocorre quando diferentes vírus influenza infectam um mesmo hospedeiro e ocorre uma troca de segmentos do RNA viral resultando na geração de novos vírus com uma nova combinação gênica (MA et al., 2009).

A ecologia do vírus influenza é complexa, pois envolve vários hospedeiros (MA et al., 2009). Os suínos são importantes nesse processo, uma vez que eles são suscetíveis à infecção por vírus influenza humano e aviário e estão relacionados à transmissão inter-espécie (BROWN et al., 2000). A co-circulação contínua de vírus influenza A em suínos pode resultar na geração de novas cepas virais. Muitos rebanhos são infectados endemicamente com frequência por mais de um subtipo, o que proporciona um risco moderado de reassortimento genético. Esse fenômeno é contínuo, com troca genética frequente entre variantes co-circulantes do mesmo vírus (BROWN, 2013). Dados de sequência disponíveis para o vírus influenza A revelam uma grande diversidade de vírus circulando na população de suínos em todo o mundo, destacando que esses animais são importantes na epidemiologia global da doença e na geração de novos vírus a partir de reassortimento, o que representa um risco de um novo surto de vírus suíno na população humana (RAJÃO et al., 2014).

Medidas visando o isolamento do vírus influenza em suínos e análises moleculares são importantes para o acompanhamento das cepas

prevalentes em uma região. A vigilância e a caracterização do vírus são essenciais para a suinocultura e também fornece informações sobre alterações genéticas que podem contribuir com a saúde humana (CHOI; GOYAL; JOO, 2002). Com a crescente demanda por testes para IAV, há um aumento na necessidade de utilização de ensaios que forneçam dados precisos, resultados rápidos, que permitem testes de múltiplas amostras e que sejam de fácil execução e rentáveis. Um diagnóstico rápido e preciso é importante para procedimentos que reduzirão a gravidade da doença (JANKE, 2000; SWENSON et al., 2001).

Os sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas são características importantes para o diagnóstico presuntivo da infecção por IAV. Porém, para o diagnóstico definitivo da doença é necessário realizar a detecção do ácido nucléico viral e/ou do antígeno viral nos tecidos e outras amostras clínicas ou o isolamento viral (DETMER et al., 2013; TORREMORELL et al., 2012; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). A detecção de anticorpos contra o vírus no soro indica infecção prévia, sendo necessária a colheita de amostras pareadas com intervalo de 3-4 semanas para determinação de infecção recente (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). As principais técnicas utilizadas para detecção de IAV são o isolamento viral, imunofluorescência (IF), imunohistoquímica (ICQ), imunocitoquímica (ICC), ELISA, teste de inibição da hemaglutinação (HI) e PCR (reação em cadeia da polimerase) (DETMER et al., 2013; JANKE, 2000).

O isolamento viral é utilizado para a multiplicação e identificação de vírus a partir de secreção nasal e fluido oral ou pulmão, onde as amostras são inoculadas em culturas de células suscetíveis e então o efeito citopático é monitorado (CHRISTOPHER-HENNINGS et al. 2012). Além de linhagens celulares estabelecidas, o isolamento viral pode ser realizado em ovos embrionados de galinhas (JANKE, 2014). Após o isolamento, a presença do vírus precisa ser confirmada pelo teste de ICC, IF, RT-PCR (transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase) ou RT-PCR em tempo real (SCHAEFER et al., 2013)

A IF direta ou indireta é realizada em cortes de pulmão congelados, podendo ser utilizados anticorpos policlonais contra o vírus total, ou anticorpos monoclonais contra proteínas virais específicas (JANKE, 2000, 2014).

A IHQ pode detectar antígenos virais em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (VINCENT et al., 1997). O antígeno pode ser visualizado no citoplasma ou no núcleo celular (JANKE, 2000, 2014). O teste de IHQ

também pode ser útil para a realização de estudos retrospectivos, quando o tecido fresco não está mais disponível (VINCENT et al., 1997). A ICC é um teste aplicado para confirmar a presença do IAV ou para titulação viral em células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) (CLAVIJO et al., 2002).

Os kits de ELISA disponíveis comercialmente são desenvolvidos para diagnóstico de infecções por influenza em seres humanos e aves. Estes testes também podem ser utilizados para diagnóstico em suínos, uma vez que utilizam anticorpos dirigidos contra antígenos conservados como a NP e proteína de matriz (JANKE, 2014).

O teste de HI detecta anticorpos circulantes que se ligam a HA presente na superfície do vírus impedindo assim a aglutinação de eritrócitos, uma propriedade da HA (JANKE, 2000). E o RNA viral em amostras clínicas pode ser detectado pela técnica de PCR (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012).

Uma vez que a NP é altamente conservada entre os vírus influenza A, anticorpos anti-NP podem ser usados para detecção de todos os subtipos do vírus em diversas técnicas (DETMER et al., 2013), sendo o anticorpo monoclonal o mais utilizado para essa finalidade (CLAVIJO et al., 2002; VINCENT et al., 1997). Entretanto, outros testes são necessários para identificação do subtipo do vírus (DETMER et al., 2013).

Considerando a necessidade e a importância do diagnóstico de influenza, o presente estudo teve como finalidade produzir anticorpos IgY anti-NP do vírus influenza A e avaliar sua aplicação na detecção do vírus em amostras de suínos. A partir dos resultados obtidos espera-se contribuir para o desenvolvimento de novos testes para diagnóstico do vírus influenza A.

REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2017. 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>, Acesso em: 02 out. 2017.
- ALEXANDER, D. J.; BROWN, I. H. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 1, p. 197–225, 2000.
- ARIAS, C. F. et al. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 8, p. 643–654, 2009.
- BOURRET, V. et al. Adaptation of avian influenza virus to a swine host. **Virus Evolution**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2017.
- BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 12, n. 26, p. D49–D53, 2008.
- BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 29–46, 2000.
- BROWN, I. H. History and epidemiology of swine influenza in europe. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 133–146, 2013.
- CAI, Y. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, n. 3, p. 385–390, 2012.
- CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody: *in vitro* and *in vivo***. 2002. 53f. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Medicine) in Clinical Chemistry, Uppsala University, Uppsala, 2002.
- CARLANDER, D; WILHELMSON, M; LARSSON, A. Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. **Food an Agricultural Immunology**, v. 15, n.1, p. 35-40, 2003.
- CHALGHOUMI, R. et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken : a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 13, n. 2, p. 295–308, 2009.
- CHAUHAN, N. et al. Laboratory diagnosis of swine flu: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 189–195, 2013.
- CHOI, Y. K.; GOYAL, S. M.; JOO, H. S. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. **Archives of Virology**, v. 147, n. 6, p. 1209–1220, 2002.
- CLAVIJO, A. et al. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**,

v. 66, n. 2, p. 117–121, 2002.

COX, R. J.; BROKSTAD, K. A.; OGRA, P. Influenza virus:immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 1–15, 2004.

CHRISTOPHER-HENNINGS J. et al. Diagnostic tests, test performance, and considerations for interpretation. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10^a edição. Ames: Iowa State University Press, 2012. p. 77-93.

DELAHAUT, P. Immunisation – choice of host , adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**, v. 116, p. 4–11, 2017.

DETMER, S. et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 85–112, 2013.

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

FLORES, E. F. et al., Orthomyxoviridae. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFMS, 2007, p. 723-754.

FORREST, H. L.; WEBSTER, R. G. Perspectives on influenza evolution and the role of research. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 3–18, 2010.

GUARNER, J. et al. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of influenza A virus infection in human lungs. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 114, n. 2, p. 227–233, 2000.

HAMPSON, A.; MACKENZIE, J. The influenza viruses. **Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 10, p. S39–S43, 2006.

HATTA, H. et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 450–454, 1993.

HE, J. et al. Evaluation of chicken igy generated against canine parvovirus viral-like particles and development of enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for canine parvovirus detection. **Viral Immunology**, v. 28, n. 9, p. 489–494, nov. 2015.

JANKE, B. H. Diagnosis of swine influenza. **Swine Health Production**, v. 8, n. 2, p. 79–84, 2000.

JANKE, B. H. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 410–426, 2014.

JARADAT, Z. W.; MARQUARDT, R. R. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. **Food and Agricultural Immunology**, v. 12, p. 263-272.

JOSEPH, C.; TOGAWA, Y. Bacterial and viral infections associated with influenza. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 7, n. Suppl. 2, p. 105–113, 2013.

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

KOWALCZYK, K. et al. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v. 54, n. 4, p. 755–762, 1985.

KUMAR, B. et al. The emerging influenza virus threat : status and new prospects for its therapy and control. **Archives of Virology**, v. 163, n. 4, p. 831–844, 2018.

LARSSON, A. et al. Chicken antibodies: taking advantage of evolution - a review. **Poultry Science**, v. 72, p. 1807–1812, 1993

LEE, K. A. et al. Acid Stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 488–493, 2002.

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

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 269–279, 2005.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulin of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 130, p. 1337–1352, 1969.

LEWIS, N. S. et al. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. **eLife**, v. 5, n. APRIL2016, p. 1–17, 2016.

LI, C. et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA. **Food Chemistry**, v. 227, p. 48–54, 2017.

LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal**, v. 46, n.3, p. 258-268.

MA, W. et al. The role of swine in the generation of novel influenza viruses. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, p. 326–337, 2009.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Defesa Sanitária Animal – Compartimentação da cadeia produtiva de suínos. 2017. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2017/31a-reuniao-ordinaria/app_defesa_animal_31ro_aves-suinos.pdf, Acesso em: 02 out. 2017

MOGHADAMI, M. A narrative review of influenza: a seasonal and pandemic disease. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 2–13, 2017.

MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 2001, p. 619–625, 2001.

MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 153–160, 2014.

NAGARAJ, S. et al. Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 136–141, 2016.

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

OPRIESSNIG, T.; GIMÉNEZ-LIROLA, L. G.; HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 133–134, 2011.

PARMA, Y. R. et al. Detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 84, p. 1–8, 2012.

PAYUNGORN, S. et al. Molecular characteristics of the human pandemic influenza A virus (H1N1). **Acta Virologica**, v. 54, n. 3, p. 155–163, 2010.

PORTELA, A.; DIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 4, p. 723–734, 2002.

RAJÃO, D. S. et al. Pathogenesis and vaccination of influenza A virus in swine. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 385, p. 307–326, 2014.

SANIEE, P. et al. Localization of H.pylori within the vacuole of candida yeast by direct immunofluorescence technique. **Archives of Iranian Medicine**, v. 16, n. 12, p. 705–710, 2013.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratories Animals**, v. 33, p. 129–154, 2005.

SCHADE, R.; HLINAK, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospect. **Altex**, v. 13, n. 1, p. 5–9, 1996.

SCHAEFER, R. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 61–73, 2013.

SERT, M.; KOC, R. C.; KILINC, Y. B. Novel fitc-labeled IgY antibody: fluorescence imaging toxoplasma gondii in vitro. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 852, 2017.

SHIMIZU, M.; FITZSIMMONS, R. C.; NAKAI, S. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **Journal**

of **Food Science**, v. 53, n. 5, p. 1360–1368, 1988.

SWENSON, S. L. et al. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 1, p. 36–42, 2001.

TAUBENBERGER, J. K.; KASH, J. C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. **Cell Host and Microbe**, v. 7, n. 6, p. 440–451, 2010.

TONG, S. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012.

TONG, S. et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1001657, 2013.

TORREMORELL, M. et al. Transmission of influenza A virus in pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. SUPPL. 1, p. 68–84, 2012.

VAN REETH, K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 243–260, 2007.

VAN REETH, K.; BROWN, I. H.; OLSEN, C. W. Influenza virus. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10th. ed. Ames: Iowa State Press, 2012. p. 557–571.

VAN REETH, K.; MA, W. Swine influenza virus vaccines: to change or not to change—that's the question. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, n. 173–200, 2013.

VINCENT, A. et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 1, p. 4–17, 2014.

VINCENT, A. L. et al. Influenza A virus vaccines for swine. **Veterinary Microbiology**, v. 206, p. 35–44, 2017.

VINCENT, L. L. et al. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 191–195, 1997.

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

WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Continuing challenges in influenza. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 115–139, 2014.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 152–79, 1992.

ZHENG, M. et al. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of nucleoprotein-based vaccine with compound 48/80 adjuvant. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 397–406, 21 fev. 2015.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir anticorpos IgY anti-NP e avaliar sua aplicação na detecção do vírus influenza A.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e obter anticorpos IgY anti-NP do vírus influenza A;
- Caracterizar imuniquimicamente os anticorpos IgY por ELISA e *western blotting*;
- Avaliar o uso de IgY anti-NP na técnica de imunocitoquímica para detecção do vírus influenza A em células MDCK infectadas;
- Avaliar uso de IgY anti-NP na técnica de imunohistoquímica para detecção do vírus influenza A em tecidos de suínos infectados.

3 ARTIGO

Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine

Miriele Caroline da Silva^a, Rejane Schaefer^b, Danielle Gava^b, Carine Kunzler Souza^c, Itabajara da Silva Vaz Jr^c, Ana Paula Bastos^b, Emerson José Venancio^{a,*}

^aDepartamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

^bEMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brazil

^cFaculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: 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

Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine

Abstract

Influenza A virus (IAV) causes an important respiratory disease in mammals and birds leading to concerns in animal production industry and public health. Usually, antibodies produced in mammals are employed in diagnostic tests. However, due to animal welfare concerns, technical advantages and the high cost of production, alternatives to the production of antibodies in mammals have been investigated. The aim of this study was to produce egg yolk immunoglobulin (IgY) in laying hens against a highly conserved protein (nucleoprotein- NP) of IAV and to evaluate the application of anti-NP IgY antibodies in virus detection by immunocytochemistry (ICC) and immunohistochemistry (IHC). Three laying hens of the White Leghorn line were inoculated seven times with a recombinant NP protein and their eggs collected seven days after the 3rd, 5th and 7th inoculations. Immunoglobulin Y antibodies were purified from egg yolk through precipitation with ammonium sulfate. The titers and specificity of the purified antibodies were determined by ELISA, western blotting, ICC and IHC. High levels of specific anti-NP antibodies were detected by ELISA after the 5th inoculation, reaching a peak after the 7th inoculation. The mean yield of total protein in yolk after the 7th inoculation was 13.5 mg/mL. The use of western blotting and ICC demonstrated that anti-NP IgY binds specifically to NP protein. Moreover, the use of anti-NP IgY antibody in ICC test revealed positive staining of MDCK cells infected with IAV of the three subtypes circulating in swine (H1N1, H1N2, and H3N2). However, no staining was observed in lung tissues through the IHC test. The data obtained showed that anti-NP IgY antibodies bound specifically to influenza virus NP protein, detecting the main virus subtypes circulating in swine, reinforcing their usefulness in the influenza diagnosis.

Keywords: Chicken IgG; Immunodiagnostic; Immunocytochemistry; Immunohistochemistry; Swine influenza.

3.1 Introduction

The influenza viruses belong to the *Orthomyxoviridae* family and are characterized by a genome composed of single-strand, negative-sense, segmented RNA (Zheng et al., 2015). The influenza A virus (IAV) can infect several animal species such as swine, avian, equine, as well marine mammals and human (Brown, 2000). H1N1, H3N2, and H1N2 are the main virus subtypes circulating endemically in swine populations worldwide (Lewis et al., 2016; Van Reeth et al., 2012). The disease is economically important for swine production due to increased production costs and reduced performance of the affected animals (Brown, 2013).

Surveillance and characterization of IAV in pigs are essential for the swine industry, as they can provide information on genetic and antigenic alterations in viruses with potential impact on human health (Choi et al., 2002). With the increasing demands for reliable tests for the diagnosis of influenza in swine, the validation of trials that provide rapid results in the analysis of multiple samples, which are easy to perform and low cost is very important (Swenson et al., 2001). For the definitive diagnosis of the disease, it is necessary to detect the viral nucleic acid and/or viral antigen in tissues or other clinical samples or to perform viral isolation (Detmer et al., 2013; Torremorel et al., 2012, Van Reeth et al., 2012). Detection of antibodies against the virus in the serum indicates previous infection, and for determination of a recent infection, paired serum samples collected at intervals of 3-4 weeks need to be analyzed (Van Reeth et al., 2012). Internal proteins such as nucleoprotein (NP) and matrix protein (M) are the most genetically conserved proteins among different subtypes of IAV (Van Reeth, 2007), with a low mutation rate during the evolution of the virus (Zheng et al., 2015). Thus, anti-NP antibodies can be used to detect all virus subtypes, and can be useful in the initial screening of clinical samples for subsequent virus characterization (Detmer et al., 2013).

Usually, antibodies employed in diagnostic tests are produced in mammals (Lee et al., 2017), and may be polyclonal or monoclonal (Narat, 2003). The procedure for obtaining these antibodies involves immunization and subsequent repeated blood collections or euthanasia of the animals (Chalghoumi et al., 2009). A non-invasive alternative method for antibody production is the use of poultry (Schade et al., 2005). Laying hens produce IgY antibodies that are transported from the blood to the egg yolk (Carlander et al., 2003) and then subsequently purified from the yolk.

An important advantage of using IgY antibodies in diagnostic tests is that these antibodies do not cross-react with Fc receptors, nor activate the complement system, thus reducing the occurrence of false-positive results (Karlsson et al., 2004). In addition, large amounts of antibodies are produced in laying hens (1 to 2.8 g of IgY per month) when compared to antibody production in rabbits (200 mg of IgG) (Schade et al., 2005). Therefore, fewer animals are utilized for this purpose, reducing production costs (Carlander et al., 2003; Narat, 2003).

Considering the importance of the diagnosis of influenza in swine, this study aimed to produce IgY antibodies in laying hens against the NP protein and to evaluate their application in the diagnosis of influenza in swine.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Production of NP antigen for immunization of laying hens

The nucleoprotein gene segment (NP) of A/swine/Brazil/12A/2010 (H1N1) strain (GenBank accession number: KM507541) was cloned into pET23d expression vector (Novagen, Tokyo, Japan). The recombinant NP (rNP) was expressed in *E. coli* BL21 using 1mM of IPTG (Fermentas, Waltham, MA, USA) at 25 °C for 2 h at 180 rpm and purified by Ni²⁺ affinity chromatography column HisTrap FF using 500mM of imidazole in a phosphate buffer (NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄, pH 7.4) (GE, Healthcare Life Sciences, Madison, WI, USA) followed by anion exchange chromatography using HiTrap Q HP eluted with 1M of NaCl, as indicated by manufacture's protocol (GE, Healthcare Life Sciences, Madison, WI, USA). Western blot was used to confirm the rNP expression and identity.

3.2.2 Animals

Three laying hens of the White Leghorn line of 20 weeks of age were used for NP protein inoculation. The animals were kept in individual cages in facilities at the School Farm of the Universidade Estadual de Londrina (UEL), and provided with water and feed *ad libitum*. The execution of this experiment was approved by the Ethics Committee on the use of animals of UEL (5217.2017.39).

3.2.3 Inoculation of animals

The laying hens were inoculated with seven doses (20 µg/dose) of recombinant NP protein on polyacrylamide gel (Harlow and Lane, 1988) intramuscularly at four points of the pectoral muscle on days 1, 14, 28, 42, 84, 126, and 168 of the experiment. The eggs were collected one week after the 3rd, 5th, and 7th inoculation (harvests during seven days) and stored at 4°C for subsequent antibody extraction and comparison of antibody levels over time. In order to evaluate non-specific IgY antibodies, to use as a negative control, eggs from non-inoculated hens were also collected.

3.2.4 Purification of IgY antibodies from egg yolk

For purification of IgY antibodies, the ammonia sulfate precipitation protocol was used, as described by Akita and Nakai (1992) with modifications. The yolk of the collected eggs was separated from the white, freed of the protective membrane, diluted at 1:7 in acidic water pH 2.5 and the resulting suspension was maintained at 4°C overnight. Subsequently, the suspension was filtered on Whatmann n° 1 for removal of the lipid portion. Next, 1:3 saturated ammonium sulfate was added and the filtration was maintained under stirring at room temperature (RT) for 30 minutes. The solution was then centrifuged at 3000g for 15 minutes and the precipitation was resuspended in 18% sodium sulfate and kept under stirring at RT for 20 minutes. After this period, the solution was centrifuged again at 3000g and the precipitation resuspended in 14% sodium sulfate at RT under stirring. The solution was centrifuged again for 20 minutes, resuspended in PBS pH 7.4, dialyzed and stored at -20°C.

The concentration of IgY was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard and its purity analyzed by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) stained with Coomassie Blue.

3.2.5 Immunochemical characterization of IgY antibodies by Western Blotting

For the western blotting technique, NP protein (10µg/mL) was mixed in sample buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 1% SDS, 0.025% blue bromophenol, 10% glycerol, 20 mM DTT) and subjected to 12.5% electrophoresis polyacrylamide gel with SDS. The antigen separated by electrophoresis was transferred to the nitrocellulose membrane at 150mA, which was held overnight at 4°C. The membrane

was subjected to Ponceau solution to confirm protein transfer, and then washed with distilled water and incubated with PBS/5% skimmed milk at 37°C for 2 hours. Thereafter, three washes were performed with PBS pH 7.4 and the membrane was incubated with anti-NP IgY antibodies or non-specific IgY (1mg/mL), diluted in PBS/1% milk for 1 hour in RT under agitation. After incubation, the membrane was washed three times with 0.05% Tween 20-PBS, before adding the goat anti-chicken IgG conjugated with peroxidase (A30-104P-Bethyl Laboratories) diluted in PBS/1% milk (1: 1000), for 1 hour at RT under stirring. The membrane was then washed three times with 0.05% Tween 20-PBS, and the revelation was performed using 5 mg 3,3'-diaminobenzidine in 30 mL PBS plus 150µL hydrogen peroxide. The revelation was interrupted with distilled water. For estimation of the molecular mass of the antigens, a standard molecular weight was used (Benchmark TM Protein ladder, 10748-010, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.2.6 Determination of antibody reactivity

The anti-NP IgY antibody levels were determined by indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). For this, microtiter plates (Corning Costar Corporation, Acton, MA, USA) of 96 wells were coated with 0.2 µg/well of NP protein in sodium carbonate-bicarbonate buffer solution, pH 9.6 and then incubated at 4°C overnight. After this time, the plates were washed three times with PBS pH 7.4 and blocked with PBS/skimmed milk powder (150 µL/well) for 2 hours at 37°C. Thereafter, three washes were performed with 0.05% Tween 20-PBS. Two-fold serial dilutions (from 2 mg/mL to 0.0312 mg/mL) of the anti-NP IgY antibodies from inoculated hens (3rd, 5th, and 7th inoculation) were used for determination of antibody reactivity. IgY antibodies were diluted in PBS/1% milk, added 100 µL/well and incubated for 1 hour at 37°C. In the negative control, IgY antibodies from non-inoculated hens were utilized. Afterwards, plates were washed three times with 0.05% Tween 20-PBS and 100 µL/well of goat anti-chicken IgG conjugated with peroxidase (A30-104P-Bethyl Laboratories) was added, in the concentration 1:40000 (diluted in PBS/1% milk), and incubated for 1 hour at 37°C. Plates were washed with 0.05% Tween 20-PBS and 100 µL/well of the sodium acetate substrate solution buffer in 0.1M pH 5.2 containing 0.1mg of tetramethylbenzidine and 0.005% of hydrogen peroxide added, followed by incubation at 37°C for 15 minutes. Finally, 50

μL /well of the 2N sulfuric acid solution was added to interrupt the reaction, and the optical density reading was performed with a 450nm filter.

3.2.7 Immunocytochemistry (ICC) test for the detection of influenza A virus in infected cells

The ICC test was performed to evaluate the anti-NP IgY antibodies produced in poultry for detection of the different subtypes (H1N1, H1N2, and H3N2) of influenza A virus isolated from pigs, in infected Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. For the ICC test, MDCK cells were infected with 2000 TCID₅₀/mL of each strain of influenza virus in 96-well microplates. After 24-48 hours of incubation at 37°C, the cells were fixed by the addition of 100 μL /well of the fixation solution (4% formaldehyde and 0.05% Tween 20-PBS). After incubation at RT for 30 minutes, the plates were washed three times with 200 μL /well of a solution of PBS-Tween 20 at 0.05%. Next, the cell monolayer was incubated at 37°C for 30 minutes with 50 μL /well of the anti-NP IgY primary antibody. Different concentrations of IgY antibodies (0.0625 mg/mL; 0.125 mg/mL; 0.25 mg/mL; 0.5 mg/mL; 0.7 mg/mL; 1 mg/mL and 2 mg/mL) were tested. Commercial monoclonal antibody ATCC HB-65 (Mab-anti-influenza A virus nucleoprotein HB-65 diluted at 1: 400) was used as a positive control of the test. As negative controls, IgY antibodies from non-inoculated hens were used, and the dilution solution was used in the place of the antibody to evaluate the occurrence of non-specific coloration in the test. Primary antibodies were diluted in 0.05% Tween 20-PBS + 1% BSA. As the secondary antibody, rabbit anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (HRP 6170 - Southern-Biotech) diluted at 1:250 or goat anti-chicken IgG conjugated with peroxidase (A30-104P-Bethyl Laboratories) was utilized at dilutions of 1:200; 1:400; 1:600; 1:800; 1:1000 and 1:1200, in the volume of 50 μL /well. The plates were then incubated for 30 minutes at 37°C. After each incubation step with primary and secondary antibodies, three washes were performed, as described above. Next, 50 μL /well of the AEC substrate (AEC-3-amino-9-ethyl-carbazole + dimethylformamide diluted in sodium acetate buffer pH 4.0 + 3% hydrogen peroxide) was added and the plates were incubated for 10 minutes at RT. The substrate was discarded and the reaction was stopped by washing the plates with distilled water. After drying the plates, the cells were observed under an inverted microscope.

3.2.8 Immunohistochemistry (IHC) test for the detection of influenza A virus in infected tissues

For the IHC test, swine lung samples with microscopic lesions suggestive of influenza A virus infection were selected and the detection of IAV was confirmed by RT-PCR and IHC using a commercial monoclonal antibody (IAV anti-nucleoprotein monoclonal antibody; MAB 8251 - Millipore). Slides with histological sections were prepared with lung tissue sectioned at a thickness of 3 µm and placed on poly-L-lysine coated glass slides. As a negative control of the technique, slides containing specific pathogen free (SPF) swine lung fragments were prepared. Between each incubation step, the slides were washed with PBS-Tween 20 at 0.05%, for 5 minutes. Pulmonary tissue sections were dewaxed in xylol and rehydrated in decreasing alcohol solutions (100, 90, 80 and 70%). Sections were treated with proteinase K (20 mg/mL, Dako), or protease (0.05%) for 15 min at room temperature, and then incubated with citrate buffer (pH 6.0) in microwave. Subsequently, the endogenous peroxidase was blocked by immersing sections in 3% hydrogen peroxide in 50% methanol. For reduction of nonspecific signals in the reaction, sections were then treated with blocking buffer (6% skimmed milk in PBS, pH 7.4) for 30 min at 37°C. The anti-NP IgY antibody was tested at various dilutions from 10 mg/mL (1:5; 1:10; 1:25; 1:50 and 1:100) at 4°C overnight. Next, goat anti-chicken IgG conjugated with peroxidase (A30-104P-Bethyl Laboratories) was added at various dilutions (1:100; 1:200; 1:400; 1:600 and 1:800) and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. In addition, two conjugated options from a commercial kit, *SuperPicTure HRP Polymer Conjugate Goat Primary* (879363 - Life Technologies) and the *EnVision + Dual Link System HRP conjugate* (K4061 - Dako) were also tested after adding the anti-IgY conjugate. Finally, the revelation was performed with AEC (AEC-3-amino-9-ethyl-carbazole + dimethylformamide diluted in sodium acetate buffer pH 4.0 in 3% hydrogen peroxide) for 5 minutes, and the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. In each test battery, IAV positive and negative slides controls were used.

3.3 Results

3.3.1 Production of anti-NP IgY antibodies

After the 7th inoculation, the mean yield of total protein in yolk was 13.5 mg/mL. The electrophoretic profile of the IgY antibodies extracted from the egg yolk of laying hens inoculated with the NP protein was analyzed by SDS-PAGE to verify the purification efficiency (Fig. 1A). The presence of proteins with a size of 65 kDa and 23 kDa, corresponding to the heavy and light chains of IgY was observed. Proteins of approximately 40 kDa were also observed, possibly due to contamination.

3.3.2 Immunochemical characterization of IgY antibodies by Western Blotting

The analysis of IgY antibodies produced after the seventh inoculation of the NP protein by western blotting revealed a band of 56 kDa, compatible with the NP protein size, whereas non-specific IgY antibodies, obtained from non-inoculated hens, showed no immunoreactivity against NP (Fig. 1B).

3.3.3 Determination of antibody reactivity

The results obtained by the ELISA, which analyzed the levels of antibodies extracted from the egg yolk, showed that inoculated hens presented high levels of anti-NP IgY antibodies from the fifth inoculation (OD = 0.387), reaching higher levels in the seventh inoculation (OD = 0.576), while non-inoculated hens demonstrated no levels of anti-NP antibodies (OD = 0.097) (Fig. 2A). After the seventh inoculation, the animals presented higher levels of anti-NP antibodies than the non-inoculated animals (Fig. 2B), with the lowest concentration of reactive antibodies of 0.125 mg/mL.

3.3.4 Immunocytochemistry

The ICC test was standardized with the primary antibody (anti-NP IgY) diluted at the concentration of 0.7mg/mL. The secondary antibody was used diluted at 1:400. Positive marking was observed in the cytoplasm and occasionally in the nucleus of MDCK cells infected by H1N1, H1N2 and H3N2 viruses. Similar cell marking was observed in the positive control and there was no marking in the negative control (Fig. 3).

3.3.5 Immunohistochemistry

No cytoplasmic or cell nucleus marking was observed in slides of influenza positive lung tested by IHC using anti-NP IgY antibody, regardless of different procedures of antigen retrieval, antibody dilution and addition of the commercial kit after the conjugate incubation. The influenza antigen was marked in the nucleus and cytoplasm of bronchi, bronchioles, alveoli epithelium and in alveolar macrophages in the positive control slide using the commercial monoclonal antibody (MAB 8251 – Millipore). No marking was visualized in the negative control slide.

3.4 Discussion

The monitoring and availability of reagents for the diagnosis of influenza A virus are of great importance for the detection of new circulating virus strains, especially those with pandemic potential, so the control measures can be taken in a short period of time. Initial screening tests using antibodies raised against IAV conserved proteins, such as the nucleoprotein, can be used to detect any IAV

subtype (Swenson et al., 2001). These antibodies can be employed in a variety of techniques, such as ELISA, immunofluorescence, IHC and ICC (Clavijo et al., 2002, Detmer et al., 2013).

Currently, antibodies obtained from egg yolk have been recognized as an alternative source for the production of large amounts of antibodies with high affinity for diagnosis and immunodetection (He et al., 2015). The IgY antibodies generated in hens present several advantages over those generated in mammals, such as high productivity, low cost, and ease to obtain, especially with respect to animal stress and well-being compared to blood collection, recognition of multiple epitopes, and no cross-reactivity with mammalian IgG determined by the evolutionary distance between the species (Dias da Silva and Tambourgi, 2010; Spillner et al., 2012; Munhoz et al., 2014).

In the present study, IgY antibodies were obtained from the egg yolk of hens inoculated against a recombinant NP protein of IAV. Influenza virus proteins have been isolated and characterized for detection of influenza viruses that infect birds (Cuceanu et al., 1991; Nguyen et al., 2010) and humans (Wen et al., 2012; Yang et al., 2014). However, to the authors' knowledge, this is the first study that describes IgY antibodies for NP and its standardization in the diagnosis of influenza A virus in swine. After inoculation of the hens with the recombinant NP protein, a continuous increase in anti-NP antibodies was observed from the third week after the initial inoculation, reaching the apex after the seventh inoculation. This profile has already been observed by other authors, using different antigens in laying hens (Han et al., 2012, Andrade et al., 2013, Jung et al., 2014). The specificity of IgY to the NP protein was confirmed by ELISA and western blotting, which was in accordance with the standard for IgY (de Paula et al., 2011) and NP (Prokudina et al., 2008). The antibodies obtained from hens inoculated with recombinant NP presented strong immunoreactivity, due possibly to properties of the NP protein which has 498 positively charged amino acids and a molecular weight of 56 kDa (Prokudina et al., 2008; Varich et al., 2014).

Antibodies are important tools in research, diagnosis, and immunotherapy (Leenaars and Hendriken, 2005). Immunoenzymatic tests are largely used in the diagnosis of influenza in swine. A commercial ELISA is widely used to detect anti-NP antibodies, showing a high sensitivity (Ciacci-Zanella et al., 2010). Recently, an ELISA test was standardized and compared to a commercial kit (AI

Multi-Screen Ab test®, IDEXX, Netherlands) by Souza et al. (manuscript submitted for publication). However, those tests indicate prior exposure of swine to IAV.

The ICC test is applied to confirm the presence of IAV in MDCK cells or viral titration (Clavijo et al., 2002) and indicates recent infection. After isolation, influenza virus samples can be characterized by genetic sequencing and antigenic cartography (Lewis et al., 2016). For the performance of ICC, as well as in IHC, the monoclonal antibody against the NP protein of IAV has been used as the primary antibody (Vincent et al., 1997).

In this study, anti-NP IgY antibodies were used as the primary antibody in immunocytochemical test for detection of IAV circulating in swine. The ICC test with IgY was able to detect the most prevalent IAV subtypes in swine (H1N1, H1N2 and H3N2) (Nelson et al., 2015; Ciacci-Zanella et al., 2015). Similar results were observed by Tsukamoto et al. (2011) where anti-H1N1 IgY antibodies, obtained from ostrich eggs, and conjugated with FITC demonstrated strong staining in the cytoplasm of IAV infected MDCK cells.

Immunohistochemistry is applied in sections of formalin-fixed tissue and is frequently used for the detection of viral antigens, which are visualized in both the cytoplasm and the nucleus (Janke, 2014). In this study, no staining was observed by the IHC test when analyzing lung samples previously diagnosed as positive for IAV, despite of high levels of specific antibodies and of recognizing NP protein of the main circulating subtypes in swine by positively labeling infected MDCK cells. The fact that the antigen is less exposed in formalin-fixed tissues could explain the negative results in the IHC, in which binding of the antibody to the antigen could have been impaired. Overall, the antigen recognition by the antibody depends on the molecular configuration of the protein (Saper and Sawchenko, 2003). The inoculated antigen used here was derived from a recombinant NP protein in polyacrylamide gel. The presentation of the NP protein to the hen's immune system in a denatured form might have influenced the non-recognition of the native form of NP protein by the IgY antibodies in IHC test. Moreover, the epitope recognized by the commercial monoclonal antibodies tested in IHC could be different from that recognized by anti-NP IgY antibodies. Alteration in the protocols for recombinant protein expression can overcome this problem, since this approach could improve the expression of recombinant protein with native folding and therefore to permit to raise antibodies

that recognize epitopes present in the native protein in the target assay (Gopal and Kumar, 2013; Rosano and Ceccarelli, 2014).

In conclusion, the proposed approach of antibody production in eggs from laying hens proved to be a viable tool and a suitable and inexpensive alternative for the detection of influenza A virus in swine, as demonstrated by the positive results in the ELISA, western blotting and ICC test.

Acknowledgments

The authors acknowledge Francieli Ianiski and Marisete F. Schiochet for laboratory assistance and Marina Schmitt for graphic design. The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarships to MCS and the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), CAPES and CNPq for financial support.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Akita, E.M., Nakai, S., 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.* 57, 629–634.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brown, I.H., 2013. History and epidemiology of swine Influenza in europe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370, 133–146.
- Brown, I.H., 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 74, 29–46.
- Carlander, D., Wilhelmson, M., Larsson, A., 2003. Immunoglobulin Y Levels in Egg Yolk From Three Chicken Genotypes. *Food Agric. Immunol.* 15, 35–41.
- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., Théwis, A., 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken : a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13, 295–308.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2002. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch. Virol.* 147, 1209–1220.
- Ciacchi-Zanella, J.R., Schaefer, R., Gava, D., Haach, V., Egídio, M., Coldebella, A., 2015. In fl uenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. *Vet. Microbiol.* 180, 118–122.
- Ciacchi-Zanella, J.R., Vincent, A.L., Prickett, J.R., Zimmerman, S.M., Zimmerman, J.J., 2010. Detection of anti-influenza a nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 3–9.
- Clavijo, A., Tresnan, D.B., Jolie, R., Zhou, E.M., 2002. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can. J. Vet. Res.* 66, 117–121.
- Cuceanu, N., Constantinescu, C., Ioniță, E., 1991. Isolation and characterization of egg yolk antibodies IgY from hens immunized with different influenza virus strains. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 50, 252–222.
- De Andrade, F.G. de, Eto, S.F., Navarro dos Santos Ferraro, A.C., Gonzales Marioto, D.T., Vieira, N.J., Cheirubim, A.P., de Paula Ramos, S., Venâncio, E.J., 2013.

- The production and characterization of anti-boitropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. *Toxicon* 66, 18–24.
- De Paula, V.S., da Silva, A. dos S., de Vasconcelos, G.A.L.B.M., Iff, E.T., Silva, M.E.M., Kappel, L.A., Cruz, P.B., Pinto, M.A., 2011. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *J. Virol. Methods* 171, 102–106.
- Detmer, S., Gramer, M., Goyal, S., Torrison, J., 2013. Diagnostics and surveillance for swine influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370, 85–112.
- Dias da Silva, W., Tambourgi, D. V, 2010. IgY : A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 173–180.
- Goodell, C. K., Prickett, J., Kittawornrat, A., Johnson, J., Zhang, J., Wang, C., Zimmerman, J. J. 2016: Evaluation of Screening Assays for the Detection of Influenza A Virus Serum Antibodies in Swine. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63, 24-35.
- Gopal, G.J., Kumar, A. 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *The Protein J.* 32, 419–425.
- Han, S., Zhang, X., Zhao, J., 2012. Production of egg yolk antibody (IgY) against recombinant canine parvovirus VP2 Protein. *Acta Sci. Vet.* 40, 1–8.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*, second. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- He, J., Wang, Y., Sun, S., Zhang, X., 2015. Evaluation of chicken IgY generated against canine parvovirus viral-like particles and development of enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for canine parvovirus detection. *Viral Immunol.* 28, 489–494.
- Janke, B.H., 2014. Influenza A virus infections in swine. *Vet. Pathol.* 51, 410–426.
- Jung, K.M., Bae, E.H., Jung, Y.T., Kim, J.W., 2014. Use of IgY antibody to recombinant avian reovirus σ C protein in the virus diagnostics. *Acta Virol.* 58, 108–113.
- Karlsson, M., Kollberg, H., Larsson, A., 2004. Chicken IgY : utilizing the evolutionary advantage. *World's Poult. Sci. J.* 60, 341–348.
- Lee, W., Syed, A., Choon, S., Heng, C., 2017. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 447, 71–85.

- Leenaars, M., Hendriksen, C.F.M., 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J.* 46, 269–279.
- Lewis, N.S., Russell, C.A., Langat, P., Anderson, T.K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D.F., Dudas, G., Fonville, J.M., Fouchier, R.A.M., Kellam, P., Koel, B.F., Lemey, P., Nguyen, T., Nuansrichy, B., Malik Peiris, J.S., Saito, T., Simon, G., Skepner, E., Takemae, N., Webby, R.J., Van Reeth, K., Brookes, S.M., Larsen, L., Watson, S.J., Brown, I.H., Vincent, A.L., Reid, S., Garcia, M.A., Harder, T., Foni, E., Markowska-Daniel, I., 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife* 5, 1–17.
- Munhoz, L.S., Vargas, G.D., Fischer, G., Lima, M. de, Esteves, P.A., Hübner, S. de O., 2014. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciência Rural* 44, 153–160.
- Narat, M., 2003. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 259–267.
- Nelson, M.I., Schaefer, R., Gava, D., Cantao, M.E., Ciacci-Zanella, J.R., 2015. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1339–1347.
- Nguyen, H.H., Tumpey, T.M., Park, H., Byun, Y., Tran, L.D., Nguyen, V.D., Kilgore, P.E., Czerkinsky, C., Katz, J.M., Seong, B.L., Song, J.M., Kim, B., Do, H.T., Nguyen, T., Nguyen, C. V, 2010. Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PLoS One* 5, e10152.
- Prokudina, E.N., Semenova, N., Chumakov, V., Stitz, L., 2008. An antigenic epitope of influenza virus nucleoprotein (NP) associated with polymeric forms of NP. *Virol. J.* 5, 37.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 5, 172.
- Saper, C.B., Sawchenko, P.E., 2003. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 465:161–163.
- 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.

- Altern. Lab. Anim. 33, 129-154.
- Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., 2012. Biologicals Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research , diagnostics and therapy. *Biologicals* 40, 313–322.
- Swenson, S.L., Vincent, L.L., Lute, B.M., Janke, B.H., Lechtenberg, K.E., Landgraf, J.G., Schmitt, B.J., Kinker, D.R., McMillen, J.K., 2001. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 36–42.
- Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., Gramer, M., 2012. Transmission of influenza A virus in Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 68–84
- Tsukamoto, M., Hiroi, S., Adachi, K., Kato, H., Inai, M., Konishi, I., Tanaka, M., Yamamoto, R., Sawa, M., Handharyani, E., Tsukamoto, Y., 2011. Antibodies against swine influenza virus neutralize the pandemic influenza virus A/H1N1. *Mol. Med. Rep.* 4, 209–214.
- Van Reeth, K., 2007. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res.* 38, 243–260.
- Van Reeth, K., Brown, I.H., Olsen, C.W., 2012. Influenza virus, in: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*. Iowa State Press, Ames, pp. 557–571.
- Varich, N.I., Sadykova, G.K., Prilipov, Alexei, G., Kochergin-Nikitsky, K.S., Webster, R.G., Kaverin, N., 2014. Location and architecture of an antibody-binding site of influenza A virus nucleoprotein. *Arch. Virol.* 159, 1493–1497.
- Vincent, L.L., Janke, B.H., Paul, P.S., Halbur, P.G., 1997. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9, 191–195.
- Wen, J., Zhao, S., He, D., Yang, Y., Li, Y., Zhu, S., 2012. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral Res.* 93, 154–159.
- Yang, Y., Wen, J., Zhao, S., Zhang, K., Zhou, Y., 2014. Prophylaxis and therapy of pandemic H1N1 virus infection using egg yolk antibody. *J. Virol. Methods* 206, 19–26.
- Zheng, M., Liu, F., Shen, Y., Wang, S., Xu, W., Fang, F., Sun, B., Xie, Z., Chen, Z., 2015. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal

administration of nucleoprotein-based vaccine with compound 48/80 adjuvant.
Hum. Vaccin. Immunother. 11, 397–406.

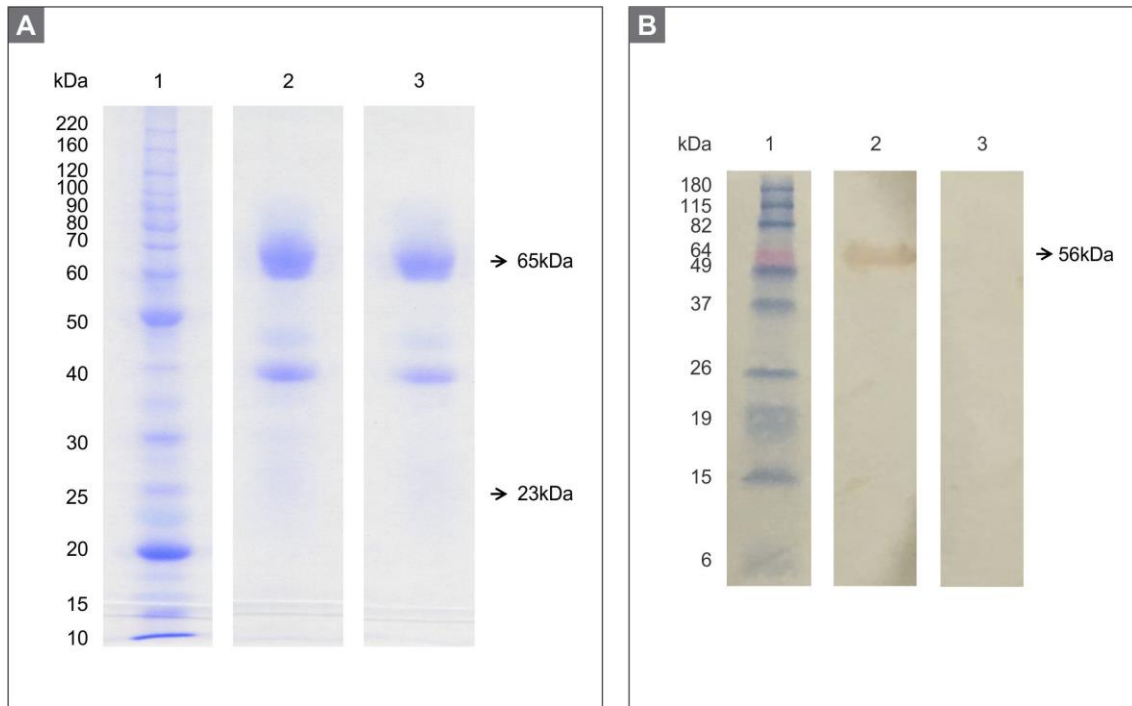


Figure 1: Electrophoretic profile and IgY antibody recognition profile purified from egg yolk of hens inoculated with NP protein of IAV. (A) Analysis of IgY purity through electrophoresis of 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE), under reducing conditions, stained with Coomassie Blue. Column 1: Molecular Mass Marker (Benchmark TM Protein ladder, 10747-012, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Column 2: anti-NP IgY obtained after seventh immunization; Column 3: Non-specific IgY. (B) Western blotting using IgY antibodies from hens inoculated and not inoculated with the NP protein at the concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ and diluted in PBS 1% milk. Column 1: Molecular Mass Marker (Benchmark TM Protein ladder, 10748-010, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Column 2: IgY obtained after seventh inoculation with the NP protein, which has a molecular mass of approximately 56 kDa; Column 3: IgY obtained from non-inoculated hens.

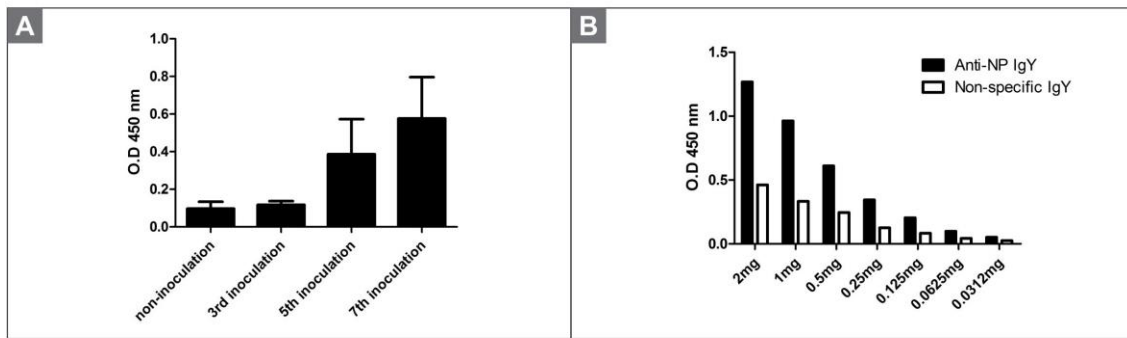


Figure 2: Production of anti-NP IgY antibodies. (A) Levels of IgY antibodies obtained from non-inoculated hens and hens inoculated with NP protein (harvest after third, fifth, and seventh inoculations), evaluated by ELISA. (B) Comparative titers of anti-NP IgY antibodies obtained from non-inoculated hens and hens after seventh inoculation with NP protein.

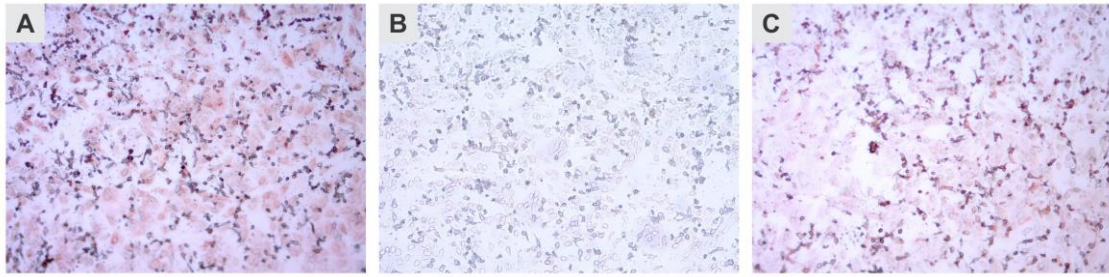


Figure 3: Immunocytochemistry test for detection of influenza A virus in infected MDCK cells. (A) Positive control using Mab-anti-influenza A HB-65 as the primary antibody. (B) Negative control using non-specific IgY. (C) Anti-NP IgY (seventh inoculation) as the primary antibody.

4 CONCLUSÃO GERAL

A inoculação de galinhas poedeiras com a NP do vírus IAV levou à produção de altos níveis de anticorpos específicos, com níveis máximos após a sétima inoculação.

Os anticorpos IgY extraídos de galinhas inoculadas com a NP reconheceram especificamente a proteína NP através do *western blotting* e foram capazes de marcar células infectadas com IAV dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 através do teste de imunocitoquímica.

A obtenção de anticorpos a partir de ovos obtidos de galinhas inoculadas mostrou ser uma ferramenta viável para detecção do vírus influenza A, uma vez que os anticorpos IgY anti-NP se ligam especificamente ao IAV, sendo capazes de reconhecer os principais subtipos de vírus circulantes em suínos (H1N1, H1N2 e H3N2).