



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA FERNANDES SANCHES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE BETA-
LACTÂMICOS E ANTICORPOS IgY ESPECÍFICOS CONTRA
Pseudomonas aeruginosa MULTIRRESISTENTES**

Londrina
2018

RENATA FERNANDES SANCHES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE BETA-
LACTÂMICOS E ANTICORPOS IgY ESPECÍFICOS CONTRA
Pseudomonas aeruginosa MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Lodrina
2018

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

R394 Sanches, Renata Fernandes .

Análise da atividade sinérgica entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes / Renata Fernandes Sanches. - Londrina, 2018.
47 f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Tese. 2. Microbiologia - Tese. 3. Sinergismo - Tese. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616-092

RENATA FERNANDES SANCHES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE BETA-LACTÂMICOS E
ANTICORPOS IgY ESPECÍFICOS CONTRA *Pseudomonas*
aeruginosa MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Suelen Balero de Paula
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 28 de maio de 2018

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e pela chance de poder cumprir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

A minha família pela paciência nos últimos tempos, pela preocupação, amor e carinho dedicados a mim. Sem vocês não seria possível trilhar este caminho.

Agradeço ao meu orientador pela oportunidade de trabalhar no Laboratório IV de Imunologia desenvolvendo esta pesquisa e também pela oportunidade de auxiliar os demais colegas em seus trabalhos de pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, onde tive a honra de conviver com professores e pesquisadores quais hoje os tomo como exemplo.

A Prof^a. Dr^a. Floristher Elaine Carrara Marroni, por ceder parte dos reagentes, equipamentos, bem como as instalações de seu laboratório para a realização de grande parte deste trabalho. Muito obrigada por todos os ensinamentos, e por ser presente e sempre solícita durante estes dois anos.

A Prof^a Dr^a Suelen Balero de Paula, por todo carinho, atenção e paciência durante esses dois anos de mestrado.

Aos componentes da banca examinadora pela contribuição durante a qualificação, meu muito obrigada.

A Prof^a. Dr^a. Sirlei Zanluchi, chefe da Farmácia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, pela gentileza em doar os fármacos utilizados para a execução dos experimentos.

A Prof^a. Dr^a Carla Cristina Silva, por ser os ouvidos e uma grande motivadora.

Aos colegas de laboratório que, de alguma, contribuíram para a construção deste trabalho, em especial às alunas de pós graduação em microbiologia orientadas pela Prof^a Floristher, Priscila e Raquel, por todo apoio e paciência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

SANCHES, Renata Fernandes. **Análise da atividade sinérgica entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes**. 47 f. 2018. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo responsável por infecções hospitalares. A emergência de bactérias multirresistentes, como *P. aeruginosa*, não é acompanhada pela descoberta de novas classes de antimicrobianos que possam combater de modo efetivo e seguro as infecções causadas por esses patógenos. A imunoglobulina Y (IgY), obtida a partir da gema do ovo de galinhas, é considerada uma importante ferramenta tecnológica na pesquisa e na imunoterapia. Anticorpos IgY tem propriedades antimicrobianas já comprovadas em estudos *in vitro* sendo seu uso investigado como adjuvante em terapias profiláticas. Tendo em vista a importância clínica de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos, este estudo teve como objetivo avaliar a ação sinérgica entre os anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* e antimicrobianos pertencentes a classe dos beta-lactâmicos. Para isso, os anticorpos IgY foram obtidos a partir do método de precipitação com sulfato de amônia. Em seguida, os anticorpos IgY foram esterilizados, quantificados pelo método de Bradford e sua pureza investigada por SDS-PAGE 10%. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos beta-lactâmicos imipenem, meropenem e ceftazidima foram obtidas pelo método de microdiluição em caldo e a atividade antimicrobiana dos anticorpos IgY através do teste de inibição. Em seguida, realizou-se o teste de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos em combinação com IgY. Os anticorpos IgY específicos anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 apresentam atividade antimicrobiana a partir de 1,25 mg/ml e anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 apresentam melhor atividade antimicrobiana a partir de 2,5 mg/ml. Quando avaliada a atividade sinérgica entre anticorpos IgY e cada beta-lactâmico selecionado, observou-se sinergismo nos momentos 48 e 72 horas. Concluímos que existe uma ação sinérgica entre anticorpos IgY específicos contra *P. aeruginosa* e que novos estudos devem ser feitos para investigar os mecanismos associados a essa ação.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Bacilos Gram-negativos. Bactérias multirresistentes. Imunoglobulina Y. Multirresistência a antimicrobianos. Sinergismo.

SANCHES, Renata Fernandes. **Analysis of the synergistic activity between beta-lactams and specific IgY antibodies against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa***. 47 p. 2018. Master's Dissertation in Clinical and Laboratory Physiopathology - Londrina State University, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacillus responsible for numerous hospital infections. The emergence of multiresistant bacteria, such as *P. aeruginosa*, is not accompanied by the discovery of new classes of antimicrobials that can effectively and safely combat infections caused by these pathogens. Immunoglobulin Y (IgY), obtained from the egg yolk of chickens, is considered an important technological tool in research and immunotherapy. IgY antibodies have proven antimicrobial properties in *in vitro* studies and their use is investigated as an adjunct in prophylactic therapies. In view of the clinical importance of antimicrobial multiresistant *P. aeruginosa* bacteria, this study aimed to evaluate the synergistic action of anti-*P. aeruginosa* IgY antibodies and antimicrobials belonging to the class of beta-lactams. For this, the IgY antibodies were obtained from the ammonium sulphate precipitation method. Then the IgY antibodies were sterilized, quantified by the Bradford method and investigated purity by SDS-PAGE 10%. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of beta-lactams imipenem, meropenem and ceftazidime were obtained by the broth microdilution method and the antimicrobial activity of IgY antibodies through the inhibition test. Thereafter, the *in vitro* sensitivity test was performed on antimicrobials in combination with IgY antibodies. The IgY anti-*P. aeruginosa* SPM-1 producing have better antimicrobial activity from 1.25 mg/ml and that anti-*P. aeruginosa* IgY antibodies VIM-2 exhibit better antimicrobial activity from 2.5 mg/ml. When synergistic activity between IgY antibodies and each selected beta-lactam was evaluated, synergism was observed at times 48 and 72 hours. We conclude that there is a synergistic action between specific IgY antibodies against *P. aeruginosa* and that further studies should be done to investigate the mechanisms associated with this action.

Keywords: Antimicrobial activity. Antimicrobial multiresistance. Gram-negative bacilli. Immunoglobulin Y. Multiresistant bacteria. Synergism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1 após 48 horas de incubação47
- Figura 2** – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1 após 72 horas de incubação47
- Figura 3** – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de VIM-2 após 48 horas de incubação47
- Figura 4** – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de VIM-2 após 72 horas de incubação47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora de SPM-1 e VIM-2.....	45
Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de anticorpos IgY anti- <i>P. aeruginosa</i> produtora de SPM-1	46
Tabela 3 – Atividade antimicrobiana de anticorpos IgY anti- <i>P. aeruginosa</i> produtora de VIM-2	46
Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de anticorpos IgY inespecíficos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATB	Antibiótico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGNMF	Bacilo Gram-Negativo Não Fermentador
CAZ	Ceftazidima
CI	Concentração Inibitória
CIF	Coeficiente de Interação Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical e Laboratory Standards Institute</i>
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
GIM	German Imipenemase
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y
IMI	Imipenem
IMP	Imipenemase
kDa	Quilodalton
MBL	Metalo-beta-lactamase
MBLs	Metalo-beta-lactamases
MEM	Meropenem
MHA	Mueller Hinton Ágar
MHB	Mueller Hinton Broth
P.a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDR	<i>Pan-Drug-Resistant</i>
RPM	Rotações por minuto
SPM	São Paulo-Metalo-beta-lactamase
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
VIM	Verona Imipenemase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	14
2.1.1	Beta-Lactâmicos De Escolha Contra Pseudomonas Aeruginosa	14
2.1.2	Mecanismos De Resistência Aos Beta-Lactâmicos.....	17
2.1.3	SPM-1 e VIM-2	17
2.2	IMUNOGLOBULINA Y.....	18
2.2.1	Contexto Histórico E Caracterização Da Imunoglobulina Y	18
2.2.2	Aplicações Da IgY	20
	REFERÊNCIAS	22
3	OBJETIVOS	28
4	RESULTADOS	29
	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICES	44

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não fermentador de glicose e aeróbio estrito (MORADALI et al., 2017). Este patógeno acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, em uso de antimicrobianos de amplo espectro e/ou dispositivos médicos invasivos. Nestes pacientes, *P. aeruginosa* pode causar diversas infecções como: infecções em queimaduras e feridas, foliculites, queratinites, endoftalmites, otites, osteomielites, meningites, infecções sanguíneas, infecção urinária e infecções pulmonares (OLIVER et al., 2015; POTRON et al., 2015; FAN et al., 2016).

A terapia tradicional utilizando os antimicrobianos pertencente à classe dos beta-lactâmicos, como por exemplo, ceftazidima, imipenem e meropenem, tem apresentado diminuição da atividade frente a microrganismos multirresistentes. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos da América ocorrem aproximadamente 51 mil infecções por *P. aeruginosa* a cada ano, e em mais de 13% dos casos, os isolados clínicos apresentam resistência a múltiplos fármacos. Por ano nos EUA, cerca de 400 mortes são atribuídas às infecções causadas por este patógeno (CDC, 2014).

A terapia tradicional utilizando os antimicrobianos pertencente à classe dos beta-lactâmicos, como por exemplo, ceftazidima, imipenem e meropenem, tem apresentado diminuição da atividade frente a microrganismos multiresistentes. A ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos gera uma preocupação em relação ao tratamento, pois sabe-se que o surgimento de novos fármacos, infelizmente, não acompanha a ocorrência de novos mecanismos de resistência.

Desde a década de 1980 o uso dos anticorpos IgY como ferramenta de pesquisa se tornou mais acessível devido a disponibilidade de reagentes comerciais que facilitavam sua purificação, além de padrões de IgY e anticorpos marcados especificamente contra IgY (SCHADE et al., 2005). Desde então, a tecnologia IgY, termo introduzido na literatura pelo Dr. Claus Staak em 1995, tem apresentado resultados satisfatórios contra microrganismos causadores de doenças em humanos, como por exemplo, *Helicobacter pylori* (SHIN et al., 2002), *Candida albicans* (WANG et al., 2008; FUJIBAYASHI et al., 2009), *Staphylococcus aureus* (GUIMARÃES et al.,

2009), *Listeria monocytogenes* (SUI et al., 2009) *Vibrio parahemolyticus* e *V. vulnificus* (NEEMA et al., 2012).

Algumas pesquisas investigaram o efeito sinérgico de substâncias antimicrobianas combinadas com diversos compostos e encontraram resultados positivos, como o efeito sinérgico mostrado pela associação do ácido ursólico (composto encontrado em folhas e frutos de ervas medicinais) com ampicilina e tetraciclina contra *Bacillus cereus* e *S. aureus* (WANG et al., 2016). Além disso, DIAMANT et al (2015), sugerem que uma combinação sinérgica de fármacos antimicrobianos poderá facilitar a redução das doses de droga, mantendo a sua eficácia.

Tendo em vista a importância clínica das bactérias *P. aeruginosa* multirresistentes a antimicrobianos, este estudo tem como objetivo analisar a atividade sinérgica de anticorpos IgY *P. aeruginosa* em combinação com os beta-lactâmicos selecionados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização e importância de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, é um bacilo Gram-negativo, não fermentador de glicose (BGNNF) e aeróbio estrito. Foi relatada pela primeira vez em infecções humanas em 1862 por Luke e isolado pela primeira vez em 1882 por Gessard, sendo então chamada *Bacillus pyocyaneus* (LYCZAK et al., 2000). Geralmente habita o solo e ambientes aquáticos, mas devido ao seu metabolismo versátil, sistemas reguladores adaptativos e resistência intrínseca a antibióticos, *P. aeruginosa* também pode ser encontrado em diversos ambientes, inclusive em ambientes hospitalares (EL ZOWALATY et al., 2015; HUBER et al., 2016).

Esta bactéria produz quatro tipos importantes de pigmentos difusíveis: piocianina, pioverdina, piomelanina e piorrubina. A piocianina e a pioverdina são mais comumente sintetizadas, conferindo às colônias uma coloração azul e amarelo-esverdeado, respectivamente. Já a piomelanina dá às colônias um aspecto marrom/preto e a piorrubina confere a cor vermelha (CORNELIS, 2008; BROOKS et al., 2014; MURRAY et al., 2017).

P. aeruginosa é um dos patógenos oportunistas responsáveis por uma variedade de infecções hospitalares, incluindo sepse, pneumonia, infecções do trato urinário, de tecidos moles, de ferida cirúrgica. Infecções que acometem pacientes imunocomprometidos, pacientes com fibrose cística, com doença pulmonar obstrutiva, com câncer, queimados, sob uso de cateteres, submetidos a transplantes de medula óssea e/ou órgãos e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ROSENTHAL et al., 2012; HUBER et al., 2016; MORADALI et al., 2017).

2.1.1 Beta-lactâmicos de Escolha Contra *Pseudomonas aeruginosa*

Os antimicrobianos que apresentam atividade contra infecções causadas por *P. aeruginosa* foram relacionados por Magiorakos et al., (2012). Desta forma, destacam-se os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina e netilmicina), carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem), cefalosporinas (ceftazidima - cefalosporina de terceira geração e cefepime - cefalosporina de quarta geração), fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino), penicilinas associadas à

inibidores de beta-lactamases (ticarcilina + ácido clavulânico e piperacilina + tazobactam), monobactâmico (aztreonam) e polimixinas (polimixina B e colistina).

Como visto, os carbapenêmicos são os beta-lactâmicos mais importantes utilizados no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes e, dentro da classe das cefalosporinas, a ceftazidima apresenta atividade antimicrobiana contra infecções causadas por *P. aeruginosa*, entretanto, os carbapenêmicos são os antimicrobianos mais importantes utilizados no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multiresistentes. Estes antimicrobianos, como beta-lactâmicos, atuam na inibição da síntese da camada de peptidoglicano da parede bacteriana, se ligando e inativando a proteína ligadora de penicilina (PBP). Esta proteína atua como enzima nesse processo, e quando inativada, a bactéria sofre lise osmótica (LAUDY et al., 2017).

Em 1945, em Sardenha, Itália, foi isolada por Giuseppe Brotzu em um canal de esgoto uma cepa de *Cephalosporium acremonium*. Anos depois, Newton et al., 1995 isolaram a cefalosporina C, antibiótico que apresentava atividade antimicrobiana contra organismos resistentes à penicilina. Ao longo dos anos, em busca de maior eficácia e baixos custos na produção das cefalosporinas, modificações na estrutura molecular foram realizadas. Atualmente, a produção da 7-ACA (ácido 7-aminocefalosporâmico) é mais viável economicamente (VALESCO et al, 2000).

Em geral, a estrutura básica das cefalosporinas consiste em um anel beta-lactâmico ligado a um anel hexamérico de dihidrotiazida. A origem do grande número de cefalosporinas disponíveis hoje no mercado é justificada por substituições nas posições 1, 3 e 7, o que afeta seu espectro, bem como sua farmacocinética (ASBEL et al, 2000). As cefalosporinas são divididas em gerações, da primeira até a quinta geração. Segundo a ANVISA (2018), apenas a ceftazidima, dentre as cefalosporinas de terceira geração, tem atividade contra *P. aeruginosa*.

As cefalosporinas de terceira geração podem ser utilizadas no tratamento de uma variedade de infecções causadas por bacilos gram-negativos sensíveis adquiridas no ambiente hospitalar, dentre elas: infecções de ferida cirúrgica, pneumonias e infecções de trato urinário complicadas. A ceftazidima apresenta boa penetração no sistema nervoso central e sua atividade contra *P. aeruginosa* torna este fármaco uma excelente opção para o tratamento de meningites. Em geral, as

cefalosporinas são antimicrobianos com boa tolerância, cujas reações adversas mais comuns são: tromboflebite (de 1 a 5%) e a hipersensibilidade (5 a 16% em pacientes alérgicos a penicilina e 1 a 2,5% em pacientes sem histórico de alergia). Estes fármacos são pouco nefrotóxicos e hepatotóxicos (ANVISA, 2018).

Os carbapenêmicos são originalmente derivados da Tienamicina, um antibiótico beta-lactâmico descoberto durante a triagem de *Streptomyces cattleya*, um fungo do solo, para a produção de inibidores da síntese de peptidoglicano em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ASBEL et al, 2000). Apresentam amplo espectro de ação para uso em infecções sistêmicas e são estáveis à maioria das beta-lactamases. Estruturalmente, os carbapenêmicos diferem dos outros beta-lactâmicos pela substituição do metileno por um enxofre na estrutura do anel pentamérico. (ASBEL et al, 2000; ANVISA, 2018).

Os carbapenêmicos não são absorvidos por via oral devido a sua instabilidade na presença do suco gástrico, sendo então administrados por via endovenosa ou intramuscular. O imipenem é associado a cilastina, evitando que enzima DHI-1 degrade o imipenem durante a passagem pelos rins, levando ao aumento no nível sérico do antimicrobiano e diminuindo a sua toxicidade renal. O meropenem não necessita ser associado a qualquer outra molécula pois não é alvo da enzima DHI-1 e não apresenta nefrotoxicidade. Estes fármacos também possuem penetração em tecidos abdominais, respiratórios, bile, trato urinário, órgãos genitais e, no caso do meropenem, líquido. Os efeitos colaterais geralmente são bem tolerados. Foi relatado um aumento de transaminases em 5% dos pacientes. As alterações hematológicas mais comuns são a trombocitose e a eosinofilia. Em 3,8% dos casos, podem ocorrer reações intestinais, como náuseas e vômitos. Pacientes alérgicos à penicilina podem apresentar reação cruzada em 1,2% dos casos. O imipenem pode reduzir o limiar convulsivo, levando ao aparecimento de convulsões, principalmente em pacientes idosos, com alterações da função renal ou cuja doença de base predisponha a convulsões. Esses efeitos são menos observados durante o uso do meropenem (ANVISA, 2018).

Imipenem, meropenem e doripenem são utilizados como último recurso para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas multirresistentes. São considerados os beta-lactâmicos mais importantes no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* MDR (MCKENNA et al, 2013; ROSTAMI et al, 2017).

2.1.2 Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos

P. aeruginosa apresenta resistência a diversas classes de antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e, mais recentemente, às polimixinas. Além dos mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* que envolvem a superexpressão de sistemas de efluxo, impermeabilidade da membrana pela perda ou alteração de porinas (OprD) outros mecanismos podem atuar de forma conjunta para a resistência aos beta-lactâmicos, como a superprodução de AmpC, de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e de carbapenemases. (POTRON et al, 2015; LAUDY et al, 2017).

Os genes codificadores de beta-lactamases e carbapenemases estão presentes, em sua maioria, em elementos genéticos móveis, que possibilitam a disseminação destes determinantes de resistência entre bactérias da mesma espécie e, em alguns casos, entre bactérias de gêneros diferentes. Como consequência, pode ocorrer o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Atualmente este problema tem sido relatado no ambiente hospitalar, onde os isolados clínicos MDR são encontrados com frequência, resultando em dificuldade no tratamento destas infecções devidos à limitação das opções terapêuticas.

2.1.3 SPM-1 e VIM-2

As metalo-beta-lactamases hidrolisam carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos, como exceção dos monobactâmicos, com muita eficiência. As MBLs IMP (Imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase), GIM (German Imipenemase) NDM (New Delhi metalo-beta-lactamase), FIM (Florence Imipenemase), HMB (Hamburgo metalo-beta-lactamase) já foram relatadas em *P. aeruginosa* (WALSH et al, 2005; YONG et al, 2009; POLLINI et al, 2013; POTRON et al, 2015; PFENNIGWERTH et al, 2017).

Em 1997, no estado de São Paulo, Brasil, um isolado clínico de *P. aeruginosa* foi analisado como parte de um programa de vigilância SENTRY, no qual mostrou a presença de um novo gene, chamado *bla*_{SPM-1} (São Paulo MBL). Esta MBL apresenta

35,5% de identidade com IMP-1 e é codificada por um gene cromossômico (TOLEMAN et al, 2002; HONG et al, 2012; POTRON et al, 2015).

No mesmo ano, em Verona, Itália, um isolado clínico de *P. aeruginosa* VR-143/97 foi isolado da ferida cirúrgica de um paciente italiano admitido no Departamento de Terapia Intensiva do Hospital Universitário de Verona. Após algumas análises, detectou-se que este isolado clínico apresentava resistência à carbenicilina, piperacilina, mezlocilina, cefoperazona, ceftazidima, cefepima, carbapenênicos e aztreonam. Este estudo também mostrou que este isolado hidrolisou o imipenem, entretanto, não foi detectado o gene *bla_{IMP}*, a MBL até então descrita em *P. aeruginosa*. Outros testes moleculares foram realizados e foi detectado um novo determinante de resistência, denominado de gene *bla_{VIM}*, responsável pela síntese da enzima VIM, posteriormente denominada VIM-1 (LAURETTI et al, 1999).

A VIM-2 foi primeiramente identificada em Marselha, França, em um isolado recuperado de hemocultura, também é resistente a maioria dos beta-lactâmicos, incluindo ceftazidima, cefepime e imipenem, exceto aztreonam. Esta MBL foi por muito tempo a MBL mais disseminada mundialmente, sendo responsável por diversos surtos de infecções hospitalares. É intimamente relacionada a VIM-1, cuja identidade dos aminoácidos é de 90% e o gene *bla_{VIM-2}* é codificado por plasmídeo (WALSH et al, 2005; POTRON et al, 2015).

2.2 IMUNOGLOBULINA Y

2.2.1 Contexto histórico e caracterização da Imunoglobulina Y

Em 1893, Klemperer descreveu pela primeira vez que a imunização de uma galinha causou a transferência de anticorpos específicos para a gema do ovo. Somente muito tempo depois, os anticorpos de gema de ovo se tornaram uma importante ferramenta de pesquisa e, conseqüentemente, estes anticorpos ganharam visibilidade no tratamento de doenças humanas e veterinárias. Isso se deu principalmente a partir da década de 1980, devido a uma maior disponibilidade de reagentes comerciais, tais como kits de purificação de IgY, padrões de IgY e IgY marcados com peroxidase, fosfatase alcalina e isotiocianato de fluoresceína (SHADE et al, 2005).

A estrutura molecular da IgY é semelhante à das imunoglobulinas de mamíferos. É constituída por duas cadeias pesadas, indicadas pela letra grega *Upsilon* (Y ou *u*) e contém um domínio variável e quatro constantes. A cadeia leve consiste de um domínio variável e um domínio constante. Comparando com IgG de mamíferos, o peso molecular da cadeia pesada de IgY é maior, sendo 65 kDa para IgY contra 50 kDa para IgG, e o peso molecular da cadeia leve é de 19 kDa para IgY contra 23 kDa para IgG de mamíferos (SUN et al., 2001). A porção Fc da IgY contém resíduos de prolina e glicina (WARR et al., 1995), e é o local da maioria das funções biológicas efectoras (SHADE et al., 2005).

Em relação ao pH e estabilidade térmica, Shimizu et al., (1992) demonstraram que IgY é mais sensível em comparação à IgG de coelhos, perdendo sua atividade em pH 3-4, mantendo-se estável em temperaturas entre 60-70°C.

De acordo com o princípio dos três Rs (*replacement, reduction and refinement*) definidos por Russell e Burch em 1959, ao utilizar animais em experimentos, devem-se substituir ao máximo técnicas invasivas, reduzir ao máximo o número de animais utilizados e refinar experimentos que utilizam animais afim de causar o mínimo de dor e angústia. Quando pensamos no uso da IgY, todos estes requisitos são atendidos, visto que a obtenção da IgY é feita a partir dos ovos, e não do soro, como é o caso dos mamíferos. Além disso, a quantidade de IgY disponibilizada por apenas uma ave é equivalente à de um grande mamífero, como uma ovelha ou uma cabra (SHADE et al., 2005), o que reforça ainda mais a conveniência do uso das aves para a produção de anticorpos.

Por não reagir de forma cruzada com fatores reumatóides, o uso de IgY em ensaios imunoenzimáticos utilizando soro (por exemplo, ELISA) é recomendado, devido à ausência de locais de ligação localizados na porção Fc (LARSSON et al., 1991). Outra vantagem do uso da IgY é a sua incapacidade de ativar a cascata do sistema complemento em mamíferos (CARLANDER et al., 2001). Estas características são justificadas pela distância filogenética entre aves e mamíferos (WARR et al., 1995; SHADE et al., 2005).

2.2.2 Aplicações da IgY

Muitos trabalhos vêm sendo publicados utilizando a IgY como ferramenta alternativa no tratamento contra diversos microrganismos. Shin et al., (2002) avaliaram o uso potencial de IgY anti-*Helicobacter pylori* na prevenção e tratamento de infecções por *H. pylori in vitro* e *in vivo*, e obtiveram resultados que nos indicam que a IgY anti-*H. pylori* pode fornecer uma nova abordagem para o gerenciamento de infecções causadas pelo *H. pylori* em seres humanos.

Wang et al., (2008), analisaram a eficácia de anticorpos IgY anti-*Candida albicans*, medindo sua capacidade de inibição do crescimento *in vitro*, obtendo resultados positivos. Fujibayashi et al., (2009) também estudaram *C. albicans* e *Candida* spp. e avaliaram a eficácia da IgY específica para desenvolver uma terapia alternativa contra a candidíase, e concluiu que é possível que a IgY seja usada como imunoterapia preventiva contra a candidíase oral e disseminada, assim como contra infecções por *Candida* spp., considerando também a IgY como imunoterapia profilática ou terapia antifúngica adjuvante.

Guimarães et al., (2009) avaliaram a capacidade de bloqueio de crescimento *Staphylococcus aureus* com IgY anti-*S. aureus* e seus achados indicam que ovos de galinha imunizados com antígenos apropriados têm potencial uso como fonte de imunidade passiva. Neema et al. (2012), investigaram o efeito inibitório de IgY contra *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, responsáveis por doenças transmitidas por crustáceos e peixes malcozidos, mostrando que houve um efeito inibitório significativo do crescimento e da multiplicação destes microrganismos em testes *in vitro* e *in vivo*, indicando ainda que estes anticorpos podem ser usados como antibiótico alternativo ou agente imunoterapêutico oral, devido ao seu efeito antibacteriano. Bachtiar et al., (2016), objetivaram elucidar o efeito da IgY anti-ComD, um receptor de superfície celular, envolvido na formação de biofilme, sobre as propriedades biológicas de *Streptococcus mutans*, e concluíram que a IgY anti-ComD pode diminuir a formação do biofilme e afetar a expressão desta proteína em *S. mutans*. Mais recentemente, Shi et al., (2017), utilizaram duas cepas de *Acinetobacter baumannii* PDR (*pan-drug-resistant*) para a produção de anticorpos IgY específicos, com o objetivo de avaliar suas atividades antibacterianas *in vitro* e *in vivo*, e seus resultados mostram que a IgY

específica pode ser usada como nova abordagem terapêutica para o tratamento de infecções por *A. baumannii* PDR.

Na literatura também se encontram trabalhos em que a IgY específica é utilizada contra *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, devido aos efeitos colaterais dos antimicrobianos utilizados, principalmente com relação ao desenvolvimento de resistência bacteriana, a pré-disposição para outras infecções oportunistas e até mesmo reações alérgicas ou tóxicas (NILSSON et al., 2007; NILSSON et al., 2008). A IgY vem, ao longo dos anos, comprovando ser uma ferramenta versátil devido ao seu baixo custo de obtenção, fácil manipulação e, por apresentar atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, podendo ser utilizada na clínica como ferramenta adjuvante profilática.

REFERÊNCIAS

ABOUT the three Rs. **Three Rs Microsite**, Ottawa, 2005-2018. Disponível em: <<http://3rs.ccac.ca/en/about/>>. Acesso em 3 jan. 2018.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos: Bases teóricas e uso clínico**. Brasil. Acesso em 26 jan. 2018.

ASBEL, L. E.; Levison, M. E. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. **Antibacterial Therapy: Pharmacodynamics, Pharmacology, Newer Agents – Infectious Disease Clinics of North America**, Filadelfia, Pensilvania v.14, n. 2. 435-447, 2000; doi: 10.1016/S0891-5520(05)70256-7

BACHTIAR, E. W. et al. Biological and Immunogenicity property of IgY anti *S. mutans* ComD. **The Open Dentistry Journal**. Jakarta, Indonesia. v. 10. 308-314, 2016; doi: 10.2174/1874210601610010308

BROOKS, G.F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2014, 872p.

CARLANDER, D.; Larsson, A. Avian antibodies can eliminate interference due to complemente activation in ELISA. **Uppsala Journal of Medical Sciences**. Uppsala, Suécia. v. 106. 189-195, 2001; doi: 10.3109/2000-1967-145

CENTERS for Disease Contol and Prevention. **Antibiotic resistenc threats in the United States**, 2013. Atlanta, GA

CORNELIS, P. **Pseudomonas: Genomics ad molecular Biology**. 1 ed. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2008, 244p.

DIAMANT, E. et al Monoclonal antibody combinations that present synergistic neutralizing activity: A platform for next-generation anti-toxin drugs. **Toxins**. v. 7. 1854-1881, 2015; doi: 10.3390/toxins7061854

EL ZOWALATY, M. E. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profile, and future antimicrobial therapies. **Future Microbiology**. Atlanta, USA. v. 10, n. 10. 1683-1706, 2015; doi: 10.2217/fmb.1548

- FAN, X. et al. Diverse Genetic Background of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Mainland China, and Emergence of an Extensively Drug-Resistant ST292 Clone in Kunming. **Science Report**. v. 6, n. 26522, 2016
- FUJIBAYASHI, T. et al. Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. Adherence and biofilm formation. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. Tokio, Japão. v.62. 337-342, 2009.
- GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. São Paulo, Brasil. v. 73. 354-360, 2012; doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007
- GUIMARÃES, M. C. C. et al. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. Espirito Santo, Brasil. v. 57. 377-382, 2009; doi: 10.1007/s00005-009-0041-x
- HONG, D. J. et al. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection e Chemotherapy**. Seul, Coreia do Sul. v. 47. n. 2. 81-97 2015; doi: 10.3947/ic.2015.472.81
- HUBER, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. **Environment Microbiology Reports**. v. 8. n. 5 564-671, 2016
- KIM, S.K; Lee, J.H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*. v. 54. n. 2 71-85, 2016
- KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**. v. 31. 356-382, 1893.
- LARSSON, A.; Karisson-Parra, A.; Sjöquist, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**. Uppsala, Suécia. v. 37. n. 3. 411-441, 1991.
- LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Siena, Toscana. v. 43. n. 7. 1584-1590, 1999.

- LOPES, H. V. O tratamento das infecções graves por *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Panamericana de Infectologia**. São Paulo, Brasil. v. 11. n. 3. 74-76, 2009
- LYCZAK, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**. v. 2. 1051-1060, 2000; doi: S1286457900012594/REV
- MAGIORAKOS, A.P., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bactéria: na international expert proposal for interim standart definitions dor acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. v. 18. n. 3. 268-281, 2012
- MCKENNA, M. Antibiotic resistance: The last resort. **Nature**. Atlanta, Georgia. v. 499. 394-396, 2013; doi: 10.1038/499394a
- MOGHOOFEI, M. et al. Morphological and bactericidal effects of amikacin, meropenem and imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*. **Jundishapur Journal of Microbiology**. Isfahan, Iran. v. 8. n. 11. 2015; doi: 10.5812/jjm.25250
- MORADALI, M.F.; Ghods, S.; Rehm, B. H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Palmeston North, Nova Zelândia. 7:39 (2017); doi: 10.3389/fcimb.2017.00039 22
- MURPHY, T. A. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. Bristol, Reino Unido. v. 47. n. 2. 582-587, 2003; doi: 10.1128/AAC.47.2.582-587.2003
- NEEMA, K. et al. The *in vitro* and *in vivo* efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. Jinju, Coréia do Sul. v. 22. n. 10. 1423-1431, 2012; doi: 10.4014/jmb.1204.04006
- NEWTON, G. G.; Abraham E. P. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid. **Nature**. Oxford, Oxfordshire. v. 26. n. 175; 548, 1955.
- NILSSON, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patientc by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagelin. **Jornal of Chromatography B**. Uppsala, Suécia. v. 856. 75-80, 2007; doi: 10.1016/j.jchromb.2007.05.029

NILSSON, E. et al. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**. Uppsala, Suécia. v. 43. 892-899. 2008; doi: 10.1002ppul.20875

OLIVER, A. et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*. 21-22: 41-59, 2015

PFENNIGWERTH, N. et al. Genetic and biochemical characterization of HMB-1, a novel subclasse B1 metallo- β -lactamase found in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Jornal of Antimicrobial Chemotherapy**. Hamburgo, Alemanha. v. 72. 1068-1073. 2017; doi: 10.1093/jac/dkw554

POTRON, A; Poirel, L; Nordmann, Pe. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Fribourg, Suíça. v. 45. 568-585, 2015; doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **American Journal of Infection Control**. Buenos Aires, Argentina. v. 40. n. 5. 396-407, 2012; doi: 10.1016/j.ajic.2011.05.020

ROSTAMI, S. et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **J Chin Med Assoc**. 2017

RUPPÉ, E; Woerther, P; Barbier, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**. v. 5. n. 21. 1-15, 2015; doi: 10.1186/s13613-015-0061-0

SCHADE, R. et al. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative to Laboratory Animals**. Berlin, Alemanha. v. 33. 1-26, 2005. 23

SHIMIZU, M. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Mie, Japão. v. 56. 270-274. 1992; doi: 10.1271/bbb.56.270

- SHI, H. et al. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Dalian, China. v. 95. 1734-1742, 2017; doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.112
- SHIN, J. et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Cheonan, Coreia do Sul. 1061-1066, 2002; doi: 10.1128/CDLI.9.5.1061-1066.2002
- 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. **Sociaty of Chemical Industry**. Qingdao, China. v.91. 1946-1950, 2011; doi: 10.1002/jsfa.4381
- SUN, S. et al. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid communications in mass spectrometry**. Changchun, China. v. 15. 708-712, 2001; doi: 10.1002/rcm.271
- TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Bristol, Reino Unido. v. 50. n. 5, 673–679, 2002; doi: 10.1093/jac/dkf210
- VALESCO, J. et al. Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*. **Nature Biotechnology**. León, Espanha. v.18. 857–861, 2000; doi: 10.1038/78467
- WALSH, T. R. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clininal Microbiological Reviews**. v. 18. n. 2. 306-325, 2005; doi: 10.1128/CRM.18.2.306-325.2005
- WANG, C. et al. Antibacterial and synergictic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. **Molecules**. v. 21. n. 139. 2016; doi: 10.3390/molecules21021039
- WANG, X. Z. et al. *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**. v. 165. 381-387, 2008; doi: 10.1007/s11046-008-9097-0 24

WARR, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. IgY: clues to the origins of modern antibodies.
Immunology Today. v. 16. n. 8. 392-398, 1995. 25

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Analisar a atividade sinérgica de anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* em combinação com os beta-lactâmicos selecionados.

Objetivos Específicos

- Obter anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa*.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos beta-lactâmicos imipenem, meropenem e ceftazidima.
- Determinar o Coeficiente de Interação Fracionária entre os anticorpos IgY e os beta-lactâmico imipenem, meropenem e ceftazidima.

4 RESULTADOS
ARTIGO 1

ATIVIDADE SINÉRGICA *IN VITRO* ENTRE BETA-LACTÂMICOS E ANTICORPOS IgY ESPECÍFICOS CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*

Renata Fernandes Sanches¹, Emerson José Venancio^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas – Universidade Estadual de Londrina

²Departamento de Ciências Patológicas – Universidade Estadual de Londrina

*Autor correspondente: Emerson José Venancio

+55 043 3371-5766, emersonj@uel.br

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina, PR 28

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo responsável por infecções hospitalares. A emergência de bactérias multirresistentes, como *P. aeruginosa*, não é acompanhada pela descoberta de novas classes de antimicrobianos que possam combater de modo efetivo e seguro as infecções causadas por esses patógenos. A imunoglobulina Y (IgY), obtida a partir da gema do ovo de galinhas, é considerada uma importante ferramenta tecnológica na pesquisa e na imunoterapia. Anticorpos IgY tem propriedades antimicrobianas já comprovadas em estudos *in vitro* sendo seu uso investigado como adjuvante em terapias profiláticas. Tendo em vista a importância clínica de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos, este estudo teve como objetivo avaliar a ação sinérgica entre os anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* e antimicrobianos pertencentes a classe dos beta-lactâmicos. Para isso, os anticorpos IgY foram obtidos a partir do método de precipitação com sulfato de amônia. Em seguida, os anticorpos IgY foram esterilizados, quantificados pelo método de Bradford e sua pureza investigada por SDS-PAGE 10%. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos beta-lactâmicos imipenem, meropenem e ceftazidima foram obtidas pelo método de microdiluição em caldo e a atividade antimicrobiana dos anticorpos IgY através do teste de inibição. Em seguida, realizou-se o teste de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos em combinação com IgY. Os anticorpos IgY específicos anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 apresentam atividade antimicrobiana a partir de 1,25 mg/ml e anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 apresentam melhor atividade antimicrobiana a partir de 2,5 mg/ml. Quando avaliada a atividade sinérgica entre anticorpos IgY e cada beta-lactâmico selecionado, observou-se sinergismo nos momentos 48 e 72 horas. Concluímos que existe uma ação sinérgica entre anticorpos IgY específicos contra *P. aeruginosa* e que novos estudos devem ser feitos para investigar os mecanismos associados a essa ação.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Bacilos Gram-negativos. Bactérias multirresistentes. Imunoglobulina Y. Multirresistência a antimicrobianos. Sinergismo.

1 Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo responsável por diversas infecções adquiridas no ambiente hospitalar, das quais podemos destacar as infecções sanguíneas, urinárias e respiratórias. Estas infecções acometem principalmente pacientes imunocomprometidos, em uso de dispositivos médicos invasivos e/ou em uso de antimicrobianos de amplo espectro (POTRON et al., 2015; MORADALI et al., 2017).

Tem sido observada taxa crescente na detecção de *P. aeruginosa* MDR. Atualmente, a terapia de escolha para o tratamento de infecções causadas por estes isolados consiste, principalmente, no uso dos carbapenêmicos imipenem e meropenem. Entretanto, segundo o relatório epidemiológico anual de 2015 divulgado pela *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), *P. aeruginosa* é responsável por 24% dos isolados resistentes aos carbapenêmicos nos casos de infecções associadas a saúde adquiridas em unidades de terapia intensiva (UTI).

Diferentes mecanismos de resistência a estes fármacos tornam o tratamento de infecções causadas por esse agente um problema no ambiente hospitalar. A ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos gera grande preocupação entre os profissionais de saúde em relação ao tratamento, uma vez que o surgimento de novos fármacos, infelizmente, não acompanha a ocorrência de novos mecanismos de resistência.

Desde a década de 1980, os anticorpos de gema de ovo (IgY) tiveram seu uso mais difundido. (SCHADE et al., 2005). Desde então, a “tecnologia IgY” vem sendo testada e gerando resultados satisfatórios, *in vitro* e *in vivo*, contra microrganismos causadores de doenças em humanos, como por exemplo, *Candida albicans* (WANG et al., 2008; FUJIBAYASHI et al., 2009), *Staphylococcus aureus* (GUIMARÃES et al., 2009), *Helicobacter pylori* (SHIN et al., 2002), *Listeria monocytogenes* (SUI et al., 2009) *Vibrio parahemolyticus* e *V. vulnificus* (NEEMA et al., 2012).

Algumas pesquisas investigam o efeito sinérgico de fármacos antibacterianos combinados com diversos compostos e encontraram resultados positivos. Wang et al., (2016) demonstraram efeito sinérgico do ácido ursólico (composto encontrado em ervas medicinais) juntamente com a ampicilina e tetraciclina contra *Bacillus cereus* e

S. aureus. Além disso, Diamant et al., (2015) sugerem que uma combinação sinérgica de drogas poderá facilitar a redução das doses de droga, mantendo a sua eficácia.

Tendo em vista a importância clínica das bactérias *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos, este estudo teve como objetivo avaliar a ação sinérgica entre os anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* e fármacos antimicrobianos.

2 Metodologia

2.1 Obtenção, Quantificação e Purificação dos Anticorpos IgY

Os anticorpos IgY foram obtidos através do processo de Precipitação com Sulfato de Amônia, descrito por Akita & Nakai, 1992, com modificações. As gemas congeladas foram diluídas 1:7 em água ácida pH 2.5, overnight a 4°C e em seguida, filtradas em papel Whatmann N°1 a 4°C 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 5000 RPM, em temperatura ambiente, por 15 minutos e o precipitado foi então dissolvido em sulfato de sódio 18% e mantido em agitação em temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, a solução foi novamente centrifugada 4000 RPM, em temperatura ambiente, e o precipitado dissolvido em sulfato de sódio 14% em temperatura ambiente sob agitação. A solução foi novamente centrifugada por 20 minutos e dissolvida em PBS (Phosphate Buffer Saline) 1X e pH 7,4 e armazenada a -20°C. Foi realizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976) para determinar a concentração da solução de IgY extraída da gema e sua pureza verificada através de eletroforese de gel de acrilamida (SDS-PAGE) 10%, corado com Comassie Blue.

2.2 Preparo do inóculo bacteriano

Isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* foram selecionados para este estudo: P.a 48, produtora de SPM-1 e P.a 23, produtora de VIM-2. Estes isolados foram disponibilizados pelo LEMRA (Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência Antimicrobiana), localizado no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná-Brasil.

Isolados de *P. aeruginosa* portadores dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-2} e os controles de qualidade *Escherichia coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram transferidos do estoque em ágar nutriente para caldo TSB (*Tryptone Soya*

Broth) e incubadas a 37°C por 16-24 horas. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri contendo MHA (*Mueller-Hinton Agar*) as quais foram incubadas a 37°C por 16-24 horas. Foi realizada a suspensão direta das colônias isoladas em MHB (*Mueller-Hinton Broth*) cátion ajustado. Em seguida, utilizando turbidímetro DensiCHEK™ Plus bioMérieux® AS, a suspensão bacteriana foi ajustada para a suspensão padrão 0,5 de McFarland. A suspensão bacteriana foi novamente diluída 1:100 em MHB cátion ajustado afim de alcançar a concentração de 5×10^4 UFC/poço. O preparo deste inóculo foi padronizado e executado em todos os experimentos a seguir.

2.3 Concentração Inibitória Mínima para Antimicrobianos

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos selecionados, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo. O protocolo utilizado seguiu as normas propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 2012.

Foram selecionados para este experimento os beta-lactâmicos ceftazidima (Ceftazidima 1g Aurobindo – Lote: BTZID5002A), meropenem (Meropenem tri-hidratado 500mg ABL Antibióticos do Brasil – Lote: 6114007D6) e imipenem (Imipenem monohidratado e cilastatina sódica 500mg ABL Antibióticos do Brasil – Lote: 4116001D6) e, do grupo das polimixinas, a polimixina B (Bedfordpoly B 50mg OPEM pharmaceuticals – Lote: 069/17), doados pela Farmácia do Hospital Universitário de Londrina, Paraná-Brasil.

As soluções estoque dos antimicrobianos selecionados foram preparadas seguindo a fórmula:

$$P \text{ (mg)} = \frac{V \text{ (ml)} * \text{Concentração desejada (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/ml)}}$$

Cada antimicrobiano foi pesado, solubilizado e diluído conforme as recomendações do CLSI. Em seguida, as soluções foram filtradas e esterilizadas em filtro Milipore MILEX® 0,22mm.

Em placas de microdiluição de 96 poços Costar®, foram distribuídos 50 µL de MHB cátion ajustado nas colunas 3-11; 100 µL da solução do antimicrobiano a 256 mg/ml na coluna 2. Foi feita diluição seriada a partir da coluna 2 até a coluna 11. Na coluna correspondente ao controle positivo para crescimento bacteriano de cada placa

(coluna 1), 100 μL de MHB cátion ajustado. Na coluna correspondente ao controle negativo para o crescimento bacteriano (coluna 12), foram distribuídos 50 μL de diluente do antimicrobiano mais μL de MHB cátion ajustado. Em seguida, foram aliqüotados 50 μL da suspensão bacteriana nos poços das colunas 1 até 11, sendo: nas linhas A e B, SPM-1; nas linhas C e D, VIM-2; nas linhas E e F, ATCC 27853, e nas linhas G e H, ATCC 25922. As placas foram incubadas a 37°C por 16-24 horas. Para avaliar o crescimento bacteriano e detectar a concentração inibitória mínima para cada antimicrobiano, foi realizada a leitura visual considerando os seguintes critérios: o controle negativo sem crescimento visível; controle positivo com crescimento visível; em caso de crescimento descontínuo entre os poços, o teste deveria ser desconsiderado. Caso estes critérios fossem atendidos, a concentração inibitória mínima do antimicrobiano foi determinada a partir do primeiro poço sem crescimento bacteriano visível.

2.4 Teste de Inibição para Imunoglobulina Y

Após a quantificação de proteínas seguindo o método de Bradford (1976), e utilizando os resultados obtidos em mg/ml, foi calculada a concentração das soluções de anticorpos, que foram diluídos em PBS 1X para 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml e 0,15625 mg/ml e armazenados em microtubos até o momento do uso.

Em placas de microdiluição de 96 poços Costar®, foram distribuídos 50 μL de caldo MHB cátion ajustado nos poços da coluna 2 a 7. Foram distribuídos 100 μL da solução de anticorpos nas colunas correspondentes a cada concentração. Os poços de controle de esterilidade foram preparados da seguinte forma: utilizando a pipeta multicanal, foram dispensados 50 μL de caldo MHB cátion ajustado, 50 μL de PBS 1X e 50 μL de Polimixina B a 256 mg/ml nos poços da coluna 8. Para o controle negativo, foram adicionados 50 μL da solução de Gentamicina 0,2 mg/ml, 50 μL de caldo MHB cátion ajustado, mais 50 μL da suspensão bacteriana nos poços da coluna 9. Para o controle de crescimento, foram adicionados 50 μL de MHB cátion ajustado, 50 μL de PBS 1X e 50 μL da suspensão bacteriana nos poços da coluna 1. Foram distribuídos 50 μL da suspensão bacteriana em cada poço da coluna 1 até a coluna 7, sendo: nas linhas A e B, SPM-1; nas linhas C e D, VIM-2; nas linhas E e F, ATCC 25922.

Logo após o preparo das placas, foi realizada uma leitura em espectrofotômetro (Biotek Synergy HT – EUA) a 600 nm e leituras em 5 tempos (a cada duas horas), além de uma leitura adicional de 24 horas, afim de acompanhar o crescimento bacteriano. No intervalo entre cada leitura, as placas foram incubadas a 37°C e, para prevenir a secagem, cada placa foi tampada e selada com saco plástico e fita aderente.

2.5 Teste de Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos em combinação com IgY

O protocolo utilizado para este teste foi adaptado de Kelly e Matsen, 1976. Em placas de microdiluição Costar®, foram adicionados 140 µL de caldo MHB cátion ajustado em todos os poços da coluna 1 até a coluna 11. Na coluna 2 foram distribuídos 20 µL do antimicrobiano a 256 mg/ml e realizada diluição seriada até a coluna 9. No sentido horizontal da placa, foram adicionados 20 µL da solução contendo IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1 a partir de 10 mg/ml até 0,078 mg/ml e IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2 a partir de 5 mg/ml até 0,078 mg/ml, em todos os poços das linhas A - H, das colunas 2 - 9. Em seguida, adicionamos 20 µL do inóculo bacteriano em todos os poços até a coluna 9. Para testar o antimicrobiano individualmente, foram distribuídos 160 µL de caldo MHB, 20 µL do antimicrobiano a 256 mg/ml e 20 µL de PBS 1X em todos os poços da coluna 10. Para testar o anticorpo separadamente, foram distribuídos 160 µL de MHB cátion ajustado, 20 µL do diluente do respectivo antimicrobiano e 20 µL da solução contendo IgY em sua mais alta concentração em todos os poços da coluna 11. As placas foram tampadas e seladas com saco plástico e fita aderente, e foram incubadas a 37°C por 48 horas, onde foi realizada a primeira leitura e uma outra adicional após 72 horas, realizada em espectrofotômetro a 600 nm.

2.6 Determinação do Coeficiente de Interação Fracionária (CIF)

Após a leitura das placas, o coeficiente de interação entre o antimicrobiano e a imunoglobulina Y testados foi avaliado por meio da determinação do Coeficiente de Interação Fracionária (CIF), baseando-se na fórmula:

$$CIF = \frac{[CI \text{ em combinação}]}{[CI \text{ IgY}]} + \frac{[CI \text{ em combinação}]}{[CI \text{ antimicrobiano}]}$$

CIF: Coeficiente de Interação fracionária; CI Concentração Inibitória; IgY Imunoglobulina Y

A partir dos resultados obtidos, as interações entre o antimicrobiano e a IgY foram definidas da seguinte forma: sinergismo se $CIF \leq 0,5$; indiferença se $CIF > 0,5$ - ≤ 4 e antagonismo quando $CIF > 4$.

3 Resultados

3.1 Quantificação e Purificação dos anticorpos IgY

O total de anticorpos específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* anti- SPM-1 foi de 34,408 mg/ml, anti-VIM-2, 19,463 mg/ml e Imunoglobulina Y inespecífica de 23,636 mg/ml.

De acordo com a escala molecular utilizada, foi identificado, para cada amostra testada, proteínas correspondentes a cadeia pesada com 65 kDa, e a cadeia leve, em torno de 23 kDa.

3.2 Concentração Inibitória Mínima para Antimicrobianos

Os dados obtidos foram comparados com os padrões propostos pelo CLSI 2012, que são divididos em três padrões: sensível, intermediário e resistente. Os resultados obtidos reforçam que, *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e VIM-2 são resistentes aos antimicrobianos testados (Tabela 1). Os controles de qualidade testados também se comportaram dentro do perfil de sensibilidade esperados, validando o teste.

3.3 Teste de Inibição para Imunoglobulina Y

A análise dos resultados sugere que anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* 1portadora de *bla*_{SPM-1} inibiu 47,3% do crescimento bacteriano na concentração de 1,25mg/ml dentro de 24 horas. (Tabela 2). Em relação aos anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* portadora de *bla*_{VIM-2}, a melhor atividade antimicrobiana foi observada a partir de 2,5 mg/ml, com inibição de crescimento de 25,2% (Tabela 3). Já para os anticorpos IgY inespecíficos, não foi observada inibição de crescimento bacteriano dentro das 24 horas (Tabela 4).

3.4 Teste de sensibilidade in vitro a antimicrobianos em combinação e determinação do Coeficiente de Interação Fracionária

Foram calculados os Coeficientes de Interação Fracionários para cada tempo e antimicrobiano testados com *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e VIM-2.

Em relação a *P. aeruginosa* produtora de SPM-1, nas primeiras 48 horas de incubação, o CIF para ceftazidima foi de 0,241, nas concentrações de 16 µg/ml de antimicrobiano + 0,625 mg/ml de IgY. O CIF para meropenem, também durante as 48 horas de incubação foi de 0,092, nas concentrações de 128 µg/ml de antimicrobiano + 1,25 mg/ml de IgY. Para o imipenem, o CIF foi de 0,174, nas concentrações de 32 µg/ml de antimicrobiano + 1,25 mg/ml de IgY. Após 72 horas de teste, o CIF para ceftazidima foi de 0,189, nas concentrações de 128 µg/ml de antimicrobiano + 0,625 de IgY. Para o meropenem, o CIF foi 0,209 nas concentrações de 128 µg/ml de antimicrobiano + 0,625 mg/ml de IgY, e o CIF para imipenem foi 0,440 µg/ml de antimicrobiano, nas concentrações de 4 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY (Figuras 1 e 2).

Sobre *P. aeruginosa* produtora de VIM-2, durante as primeiras 48 horas de incubação, o CIF para ceftazidima foi 0,421, nas concentrações de 128 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY. Para meropenem, o CIF foi de 0,310, nas concentrações de 16 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY. Em relação ao imipenem, o CIF foi 0,480, nas concentrações de 64 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY. Nas 72 horas seguintes, o CIF para ceftazidima foi 0,440, nas concentrações de 128 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY. O CIF para meropenem foi 0,453 nas concentrações de 16 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY. Já para imipenem, o CIF foi 0,441 nas concentrações de 64 µg/ml de antimicrobiano + 2,5 mg/ml de IgY. (Figuras 3 e 4).

Considerando o valor de CIF < 0,5, constatamos sinergismo entre os anticorpos IgY específicos em combinação com cada antimicrobiano testado em concentrações específicas, sugerindo que este tipo de interação inibe o crescimento bacteriano nestas condições.

4 Discussão

A resistência aos antimicrobianos limita a escolha terapêutica dos profissionais de saúde, principalmente quando o mecanismo de resistência se trata da produção de enzimas que hidrolisam os antimicrobianos. O estudo de métodos que possam

contribuir para a inibição do crescimento de patógenos de grande importância clínica, como *P. aeruginosa*, são de grande relevância.

A combinação de meropenem, imipenem e ceftazidima com IgY específica mostra que é possível inibir o crescimento, *in vitro*, de *P. aeruginosa*. Trabalhos que pesquisam a atividade sinérgica contra *P. aeruginosa*, em sua maioria, buscam novas combinações entre antimicrobianos de diferentes classes. Sy et al., (2017), observou a relação dose-resposta para oito isolados de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima e meropenem. Ao testar ceftazidima em combinação com avibactam, obtiveram uma redução entre 8 e 16% no valor da CIM. Nazli et al., (2015) combinaram amicacina e ceftazidima e encontraram efeito sinérgico em 15% das 60 cepas de *P. aeruginosa* testadas. Safarika et al., (2014) testaram a combinação de levofloxacino com imipenem e colistina contra isolados clínicos de *P. aeruginosa*, e observaram que a combinação sinérgica entre levofloxacino e imipenem foi eficiente em apenas 55,3% das amostras. Já a combinação levofloxacino e colistina (polimixina E) foi eficiente em 90,9% das amostras nas primeiras 4 horas de incubação. As polimixinas B e E apresentam atividade antimicrobiana potente e seu uso indiscriminado pode desencadear o aparecimento de microrganismos resistentes. A toxicidade limita a ampla utilização destes fármacos devido ao efeito tóxico, levando a lesões renais (ANVISA, 2018).

Guimarães et al., (2009), observaram que a IgY específica contra *S. aureus* na concentração de 5 mg/ml apresentou maior capacidade inibitória. Em nossos testes, foi observada a capacidade inibitória da IgY específica contra *P. aeruginosa* a partir de 1,25 mg/ml e 2,5 mg/ml ao utilizar os isolados produtores de SPM-1 e VIM-2, respectivamente.

Nilsson et al., (2007) avaliaram de forma promissora a atividade da IgY específica contra a flagelina de *P. aeruginosa*, o principal componente do flagelo. Ao se ligar na flagelina, a IgY compromete a mobilidade e a quimiotaxia, o que explica seu efeito inibitório contra esta bactéria. Chalghoumi et al., (2009), observaram o efeito inibitório de IgY anti-*Salmonella*, e concluíram que a atividade da IgY sobre as porinas inibiam o crescimento bacteriano. Ao se ligar às porinas, a IgY impede a passagem de nutrientes e outros compostos necessários para a manutenção e sobrevivência celular. Os anticorpos obtidos neste estudo são policlonais, apresentando especificidade por vários antígenos da superfície bacteriana, podendo comprometer o

funcionamento de estruturas importantes para a sobrevivência e manutenção da célula. Considerando estes fatos, podemos sugerir que a imunoglobulina Y pode ser uma alternativa eficaz contra o crescimento *in vitro* de *P. aeruginosa*.

Podemos concluir que os anticorpos IgY específicos contra *P. aeruginosa* multirresistentes, por apresentarem atividade antimicrobiana satisfatória, podem ser utilizados em combinação com outros antimicrobianos. Nossos testes *in vitro* dão suporte para que novos estudos sejam feitos a fim de estimular o uso do anticorpo de gema de ovo contra *P. aeruginosa*, bem como contra outros microrganismos.

Agradecimentos

CAPES, Universidade Estadual de Londrina e Hospital Universitário de Londrina.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos: Bases teóricas e uso clínico.** Brasil. Acesso em abril de 2018.
- AKITA, E. M.; Nakai, S. Immunoglobulins from Egg-Yolk -Isolation and Purification. **Journal of Food Science.** v. 57. n. 3. 629-634, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** v. 7. n. 72. 248-254, 1976.
- 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.** Gembloux, Bélgica. v. 13. n. 2. 295-308, 2009.
- CLINICAL and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2012
- DIAMANT, E. et al Monoclonal antibody combinations that present synergistic neutralizing activity: A platform for next-generation anti-toxin drugs. **Toxins.** v. 7. 1854-1881, 2015; doi: 10.3390/toxins7061854
- FUJIBAYASHI, T. et al. Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. Adherence and biofilm formation. **Japanese Journal of Infectious Diseases.** Tokio, Japão. v.62. 337-342, 2009.
- GUIMARÃES, M. C. C. et al. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.** Espirito Santo, Brasil. v. 57. 377-382, 2009; doi: 10.1007/s00005-009-0041-x
- LAUDY, A. E. et al. Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods, **PLoS ONE.** Warsaw, Polônia. v. 12 n. 6. 1-15, 2017; doi: 10.1371/journal.pone.0180121
- KELLY, M. T; Matsen, J. M. In vitro activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Utah, EUA. v. 9. n. 3. 440-447, 1976.
- MORADALI, M.F.; Ghods, S.; Rehm, B. H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and**

Infection Microbiology. Palmeston North, Nova Zelândia. v.7 n.39. 2017; doi: 10.3389/fcimb.2017.00039

NAZLI, E.; ZER, Y.; EKSI, F. In vitro efficacy of various antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* isolates **Journal of International Medical Research.** Gaziantep, Turquia. v. 43. n. 2. 217-225, 2015; doi: 10.1177/0300060514553490

NEEMA, K. et al. The *in vitro* and *in vivo* efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology.** Jinju, Coréia do Sul. v. 22. n. 10. 1423-1431, 2012; doi: 10.4014/jmb.1204.04006

NILSSON, E. et al. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology.** Uppsala, Suécia. v. 43. 892-899. 2008; doi: 10.1002ppul.20875

POTRON, A; Poirel, L; Nordmann, Pe. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents.** Fribourg, Suíça. v. 45. 568-585, 2015; doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001

SARAFIKA, A. et al. Time-kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* synergism with imipenem and colistina. **European Journal of Clinical Infection Disease.** Atenas, Grécia. v. 34. n. 2. 317-323, 2015; doi: 10.1007/s10096-014-2231-7

SCHADE, R. et al. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative to Laboratory Animals.** Berlin, Alemanha. v. 33. 1-26, 2005.

SHIN, J. et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** Cheonan, Coreia do Sul. 1061-1066, 2002; doi: 10.1128/CDLI.9.5.1061-1066.2002

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. **Sociaty of Chemical Industry.** Qingdao, China. v.91. 1946-1950, 2011; doi: 10.1002/jsfa.4381

SY, S. K. B. et. al. Potentiation of ceftazidima by avibactam against β -lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Florida, EUA. v. 72. n. 4. 1109-1117, 2017; doi: 10.1093/jac/dkw535

WANG, C. et al. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. **Molecules**. v. 21. n. 139. 2016; doi: 10.3390/molecules21021039

WANG, X. Z. et al. *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**. v. 165. 381-387, 2008; doi: 10.1007/s11046-008-9097-0 41

APÊNDICES: Figuras e tabelas

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1 e VIM-2

	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
CEFTAZIDIMA			
SPM-1			≥128 µg/ml
VIM-2			≥128 µg/ml
ATCC 27853	1 µg/ml		
ATCC 25922	≤0,25 µg/ml		
IMIPENEM			
SPM-1			32 µg/ml
VIM-2			128 µg/ml
ATCC 27853	1 µg/ml		
ATCC 25922	≤0,25 µg/ml		
MEROPENEM			
SPM-1			64 µg/ml
VIM-2			≥128 µg/ml
ATCC 27853	≤0,25 µg/ml		
ATCC 25922	≤0,25 µg/ml		
POLIMIXINA B			
SPM-1	2 µg/ml		
VIM-2	2 µg/ml		
ATCC 27853	1 µg/ml		
ATCC 25922	1 µg/ml		

Valores obtidos através de leitura visual, considerando os critérios para a validação do teste.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana de anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de SPM-1.

SPM - 1	Controle positivo	5mg/ml	2.5mg/ml	1.25mg/ml	0.625mg/ml	0.312mg/ml	Controle de esterilidade	Controle negativo
0 Horas	0,043	0,054	0,047	0,041	0,042	0,041	0,046	0,048
8 Horas	0,152	0,096	0,083	0,063	0,074	0,061	0,054	0,057
24 Horas	1,157	0,814	0,780	0,684	1,247	1,429	0,056	0,057

Valores médios de densidade ótica obtidos após a leitura em espectrofotômetro. A faixa de melhor atividade antimicrobiana é a partir de 1,25 mg/ml.

Os controles de esterilidade e negativos não apresentaram crescimento, validando o teste. Leitura em 600 nm.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana de anticorpos IgY anti-*P. aeruginosa* produtora de VIM-2.

VIM - 2	Controle positivo	5mg/ml	2.5mg/ml	1.25mg/ml	0.625mg/ml	0.312mg/ml	Controle de esterilidade	Controle negativo
0 Horas	0,040	0,090	0,054	0,050	0,048	0,044	0,036	0,038
8 Horas	0,199	0,179	0,155	0,109	0,136	0,114	0,038	0,041
24 Horas	1,310	1,271	1,058	1,323	1,656	1,795	0,040	0,043

Valores médios de densidade ótica obtidos após a leitura em espectrofotômetro. A faixa de melhor atividade antimicrobiana é a partir de 2,5 mg/ml.

Os controles de esterilidade e negativos não apresentaram crescimento, validando o teste. Leitura em 600 nm.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana de anticorpos IgY inespecíficos

INESPECÍFICO	Controle positivo	5mg/ml	2.5mg/ml	1.25mg/ml	0.625mg/ml	0.312mg/ml	Controle de esterilidade	Controle negativo
0 Horas	0,043	0,065	0,050	0,052	0,049	0,049	0,048	0,048
8 Horas	0,172	0,123	0,105	0,135	0,124	0,108	0,055	0,055
24 Horas	1,506	1,563	1,475	1,487	1,480	1,459	0,057	0,055

Valores médios de densidade ótica obtidos após a leitura em espectrofotômetro. Neste caso observamos que não há atividade antimicrobiana dentro das 24 horas, confirmando que a inespecificidade não garante inibição do crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas.

Os controles de esterilidade e negativos não apresentaram crescimento, validando o teste. Leitura em 600 nm.

Figura 1 – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1 após 48 horas de incubação.

Beta-lactâmico	CIF	Concentração ATB - IgY
Ceftazidima	0,241	16 µg/ml – 0,625 mg/ml
Meropenem	0,092	128 µg/ml – 1,25 mg/ml
Imipenem	0,174	32 µg/ml – 1,25 mg/ml

O Coeficiente de Interação Fracionária (CIF) é um índice que determina a interação *in vitro* entre dois ou mais compostos.

Figura 2 – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1 após 72 horas de incubação.

Beta-lactâmico	CIF	Concentração ATB - IgY
Ceftazidima	0,189	128 µg/ml – 0,625 mg/ml
Meropenem	0,209	128 µg/ml – 0,625 mg/ml
Imipenem	0,440	4 µg/ml – 2,5 mg/ml

O Coeficiente de Interação Fracionária (CIF) é um índice que determina a interação *in vitro* entre dois ou mais compostos.

Figura 3 – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de VIM-2 após 48 horas de incubação.

Beta-lactâmico	CIF	Concentração ATB - IgY
Ceftazidima	0,421	128 µg/ml – 2,5 mg/ml
Meropenem	0,310	16 µg/ml – 2,5 mg/ml
Imipenem	0,486	64 µg/ml – 2,5 mg/ml

O Coeficiente de Interação Fracionária (CIF) é um índice que determina a interação *in vitro* entre dois ou mais compostos.

Figura 4 – Coeficiente de Interação Fracionária entre beta-lactâmicos e anticorpos IgY específicos contra *Pseudomonas aeruginosa* produtora de VIM-2 após 72 horas de incubação.

Beta-lactâmico	CIF	Concentração ATB - IgY
Ceftazidima	0,440	128 µg/ml – 2,5 mg/ml
Meropenem	0,453	16 µg/ml – 2,5 mg/ml
Imipenem	0,441	64 µg/ml – 2,5 mg/ml

O Coeficiente de Interação Fracionária (CIF) é um índice que determina a interação *in vitro* entre dois ou mais compostos.