

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ELISABETE SALES CORRÊA

**INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROENTÉRICA E DESENVOLVIMENTO  
DE IgY PARA FINS DIAGNÓSTICOS EM EMA (*Rhea americana*)**

ORIENTADOR: OLNEY VIEIRA DA MOTTA

COORIENTADOR: CARLOS JORGE LOGULLO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

SETEMBRO, 2015

**INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROENTÉRICA E DESENVOLVIMENTO  
DE IgY PARA FINS DIAGNÓSTICOS EM EMA (*Rhea americana*)**

ELISABETE SALES CORRÊA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Enfermidades Infecto-contagiosas e Parasitárias dos animais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADOR: OLNEY VIEIRA DA MOTTA

COORIENTADOR: CARLOS JORGE LOGULLO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

SETEMBRO 2015

ELISABETE SALES CORRÊA

**INVESTIGAÇÃO D A MICROBIOTA GASTROENTÉRICA E DESENVOLVIMENTO  
DE IgY PARA FINS DIAGNÓSTICOS EM EMA (*Rhea americana*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Enfermidades Infecto-contagiosas e Parasitárias dos animais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 30 de Setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

---

Professora Dalia dos Prazeres Rodrigues (Doutora em Ciências- Bacteriologia) – FIOCRUZ/RJ

---

Professora Susana Campoy Sánchez (Doutora em Ciências Biológicas) Universidade Autônoma de Barcelona/ Espanha

---

Professor Milton Masahico Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF/RJ

---

Professor Olney Vieira da Motta (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF/RJ

ORIENTADOR

*Nascer, aprender sempre, e renascer...*

*Essa é a lei!*

À Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas, que me deu a oportunidade da vida.

Ao meu marido, pelo amor, compreensão, paciência e esforços para que esse sonho se concretizasse.

Aos meus filhos (presentes de Deus), pelos abraços e beijos, pela compreensão e por serem a minha grande motivação. TUDO ISSO FOI POR VOCÊS E PARA VOCÊS.

DEDICO

Homenagem especial,

Aos meus pais, pelo amor de toda uma vida e principalmente pelo exemplo de trabalho e honestidade.

## Agradecimento especial

Ao meu orientador, Olney Vieira da Motta, pela confiança e oportunidade e pelo precioso tempo dedicado a mim durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, pela confiança, pelo incentivo e pela preciosa colaboração.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos PDSE que possibilitou executar parte do meu doutorado na Universitat Autònoma de Barcelona em Barcelona, Espanha.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos ao longo do meu doutorado no Brasil.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Laboratório de Sanidade Animal, ao corpo docente e administrativo, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

À Universitat Autònoma de Barcelona, pela concessão de uso das suas dependências para efetuar os experimentos do projeto.

Aos meus orientadores, Prof. Olney e Prof. Logullo, agradeço mais uma vez e sempre.

À Dra. Susana Campoy, pela paciência, boa vontade e gentileza durante o período em que estive sob sua orientação em Barcelona.

Ao Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira e Professora Karoll Andrea Alfonso Torres-Cordido, pelo acesso ao Emário da Universidade Estadual do Norte Fluminense favorecendo a execução do experimento com as emas.

À Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte e ao criatório conservacionista “Parque ecológico Camilo Cola”, pelo acesso às emas.

À Cooperativa Perim em Venda Nova do Imigrante – ES, pela doação das galinhas utilizadas nesse experimento.

À Professora Paula Di Filippo e ao setor de Grandes animais, pelos cuidados com o caprino utilizado nesse experimento.

Ao Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos, por ter doado as culturas de células utilizadas nesse estudo.

Ao meu amigo, IC e companheiro para todas as horas, Leonardo Willian da Silva Pinto, sem você não teria conseguido. “companheiro é companheiro!”

Aos meus amigos e colaboradores do LSA: Lourdes (por tudo e muito mais), Gina, Luciana Mathias (por tanto carinho e boa vontade em ajudar), Fabiola (querida Fabes), Luiz, Indiara, Luize, Fernando Tobias,

Marcella, Mariana, Maria Luiza, Fernanda, Deivid, Andrea, Solange, Claudia e Sueli por compartilhar inúmeras placas de Petri, muitas risadas e, principalmente, pela troca de tantos conhecimentos, momentos alegres e produtivos.

Aos meus amigos da UEA: Camila (por tudo e pelas aulas de Espanhol), Criscila lindona, Seu Jorge (filhote), Barbara, Niltinho, Elane, Drica, Mauricio, Renato, Mariana, Newton, Christiano, Luan, Leo Abreu, Daniela, Jhenifer, Josias, Claudinha, Marcelle, Mikaela, Yolanda, Adrian e Gabriel. Foi um prazer poder trabalhar no mesmo laboratório que vocês. Lembrarei sempre dos momentos compartilhados, das conversas, dos *Journals*, das tarefas, faxinas e de muitas confraternizações.

Aos amigos da Fiocruz: Renata, André, Emily, Gisele, Roberta, Ingrid Annes, Dra. Eliane, Luiza, Marcia, Beth e principalmente Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, por sempre me receberem com tanto carinho e confiança.

Aos meus amigos e colaboradores: Juan Carlos e Denise, Fernando (Camila) e Inácio que muito me ajudaram no manejo das emas e galinhas. A querida Zila pelos muitos géis, e Anderson Morales pelos esclarecimentos em estatística.

Aos meus irmãos: Márcia ('minha rimãzinha minha'), Juninho e Cláudia. Cada um sabe o papel importante que representa na minha vida. Obrigada pela infância, por compartilhar momentos que só quem é família sabe. 'Todo mundo precisa de irmãos'. Amo vocês.

Aos meus sobrinhos que amo muito e que desejo, tanto quanto aos meus filhos, a mesma chance de estudarem e terem um futuro rico em oportunidades.

Aos meus cunhados: Tio Edi, Madrinha Irian, tio Farlei, Andressa e tia Rubia pelo carinho, incentivo e momentos de alegria.

À minha amada tia (mãe) Ângela Maria de Castro, que sempre acreditou em mim, mais até que eu mesma.

A 'minha cachorrinha minha': Zuzu, companheira de todas as horas.

E a todos que, direta ou indiretamente, me acompanharam nessa estrada, meu muito obrigada.

*“Deus quer, o homem sonha e a obra nasce”*

*Fernando Pessoa*

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe e vencer com ousadia,  
pois o triunfo pertence a quem se atreve...  
a vida é muita para ser insignificante”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

IgG anti-IgY de ema (*Rhea americana*) foi produzida em caprino e coelho para uso como imunoferramenta diagnóstica para a espécie. A IgY de ema se mostrou mais imunogênica para o caprino que para os coelhos. Foi observado por ELISA alta especificidade desses anticorpos para a espécie estudada, sendo o antiema produzido em coelhos mais específica para fins diagnósticos na espécie. IgY de gema de ovos de ema foi isolada por precipitação por sulfato de amônia a 29% e purificação em coluna de afinidade, pelo que foi possível observar as cadeias leves e pesada da imunoglobulina com aproximadamente 30 kDa e 70 kDa, respectivamente. Proteína recombinante anti-flagelina de fase dois de *Salmonella enterica* sv. Enteritidis PT4 (recFljB) foi eficientemente obtida utilizando as construções plasmídeal pGEX-fljB em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e BL21(DE3) e utilizada para imunizar emas e galinhas. A IgY específica anti-recFljB foi obtida da gema de ovos dessas aves com alto rendimento (4,82 mg/mL para galinhas e 11,68 mg/mL para emas). IgY anti-recFljB obtidas de ovos de emas e galinhas diminuiu a capacidade de aderência e invasão das cepas *S. Enteritidis* PT4 e *Salmonella enterica* sv. Typhimurium em células CACO-2 e HT-29, respectivamente. IgY anti-recFljB de emas e galinhas também foi capaz de inibir o crescimento dessas bactéria em meio líquido (BHI 0,3M de NaCl). Foram isolados 203 microrganismos de 63 emas de cativeiro clinicamente saudáveis provenientes de três criatórios diferentes entre 2012 e 2014. Sendo 132 bactérias Gram-negativas, potencialmente patogênicas e resistentes fenotipicamente a antibióticos da microbiota oral e cloacal das emas (*E. coli*, *Escherichia fergusonii*, *Edwardsiella* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp., *Francisella* spp., *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Bordetella avium*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.). Por PCR identificou-se 11,6% de cepas de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC). Genes de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram identificados em *E. coli* (22,1% bla<sub>CTX-M</sub>, 26,7% de bla<sub>SHV</sub> e 14% bla<sub>TEM</sub>) e em *Klebsiella* spp. (100% de bla<sub>SHV</sub> e 14,3% bla<sub>TEM</sub>). Foram isoladas 71 bactérias Gram-positivas, potencialmente patogênicas, e com resistência a antimicrobianos, da microbiota oral e cloacal das emas: *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCN), *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., e *Micrococcus* spp. Por PCR identificou-se a presença do gene *mecA* em 44,4% dos SCN e das enterotoxinas SEA (66,7%) e SEB(8,3%) nas cepas SCN. A identificação da microbiota das emas pode auxiliar na prevenção de diferentes patologias, assim como fornecer dados para estudos da epidemiologia das bactérias. Os resultados deste estudo também podem ser utilizados para a criação de novas estratégias de profilaxia de doenças, como por exemplo, a utilização e imunoglobulinas aviárias específicas. Ainda foi discutido o fato das emas abrigarem bactérias resistentes a antibióticos e produtoras de enterotoxinas e, por isso, serem veículo de disseminação dessas linhagens de microrganismos. Nesse sentido, o presente estudo pode contribuir para o fornecimento de novas informações sobre a associação de microrganismos potencialmente patogênicos em *Rhea americana*, além de demonstrar a necessidade da realização de novas pesquisas focadas nas diferentes temáticas levantadas e no monitoramento de microrganismos em aves silvestres e de cativeiro.

Palavras-chave: IgY; Proteína recombinante; *FljB*; inibição de crescimento; cultura de células; *Rhea americana*

## ABSTRACT

IgG anti-IgY from greater rhea (*Rhea americana*) was produced in goat and rabbit, for use as an immunodiagnostic tool for the species, and greater rhea's IgY was more immunogenic for the goat than for rabbits. ELISA assays show high specificity of these antibodies for this species, and the anti-greater rhea produced in rabbits were more specific for diagnostic purposes in the species. IgY greater rhea egg yolk was isolated by precipitation by ammonium sulfate at 29% and purification was performed by affinity column where it was possible to observe light and heavy chains of immunoglobulin approximately 30 kDa and 70 kDa, respectively. Recombinant Protein anti-flagellin of phase two of *Salmonella enterica* sv. Enteritidis PT4 (recFljB) was efficiently obtained using the constructions plasmidial pGEX-fljB in *E. coli* DH5 $\alpha$  and BL21 (DE3) and used to immunize rheas and hens and an IgY specific anti-recFljB was obtained from egg yolk of these birds with high yield (4.82 mg/mL for hens and 11.68 mg/mL for rheas). IgY anti-recFljB obtained from eggs of rheas and hens decreased the adhesion and invasion of the strains *S. enteritidis* PT4 and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium in CACO-2 and HT-29 cells, respectively. IgY anti-recFljB from rheas and hens was also able to inhibit the growth of these bacteria in liquid medium (BHI 0.3M NaCl). 203 microorganisms were isolated from 63 clinically healthy rheas kept in captivity from three different CEMAS, between 2012 and 2014. 132 bacteria were Gram-negative, potentially pathogenic and phenotypically resistant to antibiotics, from oral and cloacal microbiota of rheas (*E. coli*, *Escherichia fergusonii*, *Edwardsiella* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp., *Francisella* spp., *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Bordetella avium*, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.). 11.6% of strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was identified by PCR. Beta lactam antibiotic resistance genes were identified in *E. coli* (22.1% blaCTX-M, 26.7% of blaSHV and 14% blaTEM) and *Klebsiella* spp. (100% of blaSHV and 14.3% blaTEM). 71 Gram-positive bacteria were isolated from the oral and cloacal microbiota of rheas, all of them potentially pathogenic and with resistance to antimicrobials: coagulase negative *Staphylococcus* (CNS), *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., and *Micrococcus* spp. The presence of the *mecA* gene was confirmed by PCR in 44.4 % of CNS and enterotoxins SEA (66.7 %) and SEB (8.3 %) were confirmed in CNS strains. The identification of the microbiota of rheas can help in the prevention of various diseases, as well as provide data for epidemiological studies of bacteria. The results of this study may also be used for the creation of new strategies for prophylaxis diseases, such as the use and avian specific immunoglobulins. The fact that greater rheas may shelter antibiotic-resistant and enterotoxin producing bacteria has also been discussed and therefore they would act as a dissemination vehicle of these strains of microorganisms. In this sense, the present study may contribute to the provision of new information on the association of potentially pathogenic microorganisms in *Rhea americana*, as well as to demonstrate the need for further research focused on different themes raised and monitoring microorganisms in wild birds and in captivity.

Keywords: IgY; Recombinant protein; FljB; growth inhibition; cell culture; *Rhea americana*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1a. Vista longitudinal esquemática do flagelo de *S. Typhimurium* e do monômero de flagelina.

FIGURA 1b: Variação de fase flagelar em *Salmonella*

FIGURA 2. Estrutura de IgG e IgY

FIGURA 3. Perfil eletroforético da IgY de ema purificada em coluna HiTrap™ IgY™ – GE.

FIGURA 4. Titulação por ELISA de anticorpos IgG de Caprino e coelho anti-IgY.

FIGURA 5. Perfil eletroforético da IgG de coelho.

FIGURA 6. Titulação por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-ema produzido em caprino e coelho frente ao soro de diferentes espécies animais.

FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR: gene *fljB*; gene *fimA* e gene *sefA*.

FIGURA 8: Expressão dos clones BL21-FljB, BL21-FimA e BL21-SefA.

FIGURA 9. Perfil eletroforético das etapas de purificação das proteínas recombinantes FimA e FljB de *S. Enteritidis* expressas em cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

FIGURA 10: Concentração de IgY de ovos de galinhas obtida por BCA.

FIGURA 11: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras de IgY obtidas de preparações individuais de diferentes ovos de ema e galinhas .

FIGURA 12: Western blot mostrando o reconhecimento da proteína recombinante FljB

FIGURA 13: Titulação, por ELISA, dos anticorpos IgY anti-recFljB nos soros de galinhas, pré e pós imunizações, a partir de uma diluição de 1:500.

FIGURA 14: Titulação, por ELISA, dos anticorpos IgY anti-recFljB nos soros de emas, pré e pós imunizações, a partir de uma diluição de 1:500.

FIGURA 15: Cinética de produção de IgY nas amostras de gema de ovos de galinhas durante 10 semanas e ema durante 28 dias obtida pelo teste ELISA.

FIGURA 16. Efeito de diferentes concentrações de IgY anti-recFljB produzido em ema no crescimento de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em meio líquido.

FIGURA 17. Efeito de diferentes concentrações de IgY anti-recFljB produzido em galinhas no crescimento de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em meio líquido.

FIGURA 18: Efeito da IgY anti-recFljB no crescimento de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium produzidos em ema e galinhas observados pela diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do número de UFC nos grupos tratados com IgY específica (pós-imune) comparado com os grupos controle (sem IgY) e pré-imune (IgY inespecífica).

FIGURA 19: Comparação do crescimento de *Salmonella* Typhimurium tratadas com IgY pré-imunização e IgY anti-recFljB em Ágar Nutriente em diferentes diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$ ). Concentração de igY foi de 3,0 mg/mL.

FIGURA 20: Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema e galinhas, na aderência de *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium em monocamada de células caco-2.

FIGURA 21. Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema e galinhas, na aderência de *Salmonella* Enteritidis em ágar nutriente na diluição  $10^{-3}$ .

FIGURA 22. Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema e galinhas, na aderência de *Salmonella* Typhimurium em ágar nutriente na diluição  $10^{-3}$

FIGURA 23: Eficiência da invasão das cepas *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* tratadas com IgY anti- recFljB (hiperimune) produzidos em ovos de ema e galinhas em células HT-29.

FIGURA 24. Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema e galinhas, na invasão de *Salmonella* Enteritidis em ágar nutriente na diluição  $10^{-1}$ .

FIGURA 25. Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema e galinhas, na invasão de *Salmonella* Typhimurium em ágar nutriente na diluição  $10^{-2}$ .

FIGURA 26: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese da PCR para genes *eae* , *bfpA* e *stx* das cepas de *E. coli* isoladas de *Rhea americana*

FIGURA 27. Gel de agarose 1,5% resultante da eletroforese da PCR Multiplex para genes de enterotoxinas de *Staphylococcus coagulase* negativa.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequência dos oligonucleotídeos de genes específicos de *Escherichia coli* e *Staphilococcus* spp. utilizados nesse estudo.

TABELA 2: Frequência de microrganismos Gram- negativos isolados de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

TABELA 3: Microrganismos Gram-positivos isolados de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

## LISTA DE QUADROS:

QUADRO 1. Comparação das características de IgG de mamíferos e IgY de galinha.

QUADRO 2: As investigações sobre a utilização de IgY específica para o controle de doenças entéricas.

QUADRO 3: As investigações sobre a utilização de IgY específica no controle de doenças não-entéricas.

QUADRO 4: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

QUADRO 5: Perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* e *Enterococcus* sp. isoladas de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro no período de 2012-2014.

## ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BCA - *Ácido Bicinconínico*

BHI - *Brain Heart Infusion*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DO – densidade ótica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

ESBL - beta-lactamases de espectro estendido

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

HVA – Vírus da hepatite A

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBDV - Vírus da Doença Infecciosa Bursal

IgG – imunoglobulina G

IgY – imunoglobulina de gema de ovo

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

KDa –quilo Dalton

LB – Luria Bertani (meio de cultura)

LPS – Lipopolisacarídeo

MLVA - multi-locus variable-number

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NCTC - *National Collection of Type Cultures*

NM – nanômetro

OMP - *outer membrane proteins*

OPD - orto-fenildiamina

PB – pares de base

PBS – tampão fosfato salino

PBST - tampão fosfato salino acrescido de Tween 20

PBSTG - tampão fosfato salino acrescido de Tween 20 e gelatina

RPM – rotação por minuto

SARS - *Severe acute respiratory syndrome*

SE – *Salmonella* Enteritidis

SIM - *Sulfide, Indole and Motility*

SPI – ilha de patogenicidade de *Salmonella*

SSTT - Sistema de secreção tipo III

ST – *Salmonella* Typhimurium

TSI - *Triple Sugar Iron*

UFC – unidade formadora de colônia

VM - vermelho de metila

VP - Voges-Proskauer

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 A EMA .....	24
2.2 Salmonella spp.....	26
2.2.1 <i>Samonella</i> e aves silvestres .....	27
2.2.2 <i>Salmonella</i> em Emas.....	28
2.3 FLAGELO .....	29
2.3.1 FliB – Flagelina de fase 2.....	31
2.4 EGG YOLK IMMUNOGLOBULIN (IgY) .....	32
2.4.1 Estrutura e função da IgY .....	32
2.4.2 Modo de ação.....	33
2.4.3. Aplicação para a IgY .....	34
3 JUSTIFICATIVA .....	38
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 OBJETIVO GERAL .....	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5 - CAPÍTULO 1.....	40
EFEITO DA IgY anti-recFliB de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 PRODUZIDA EM OVOS DE EMA E GALINHAS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO, ADESÃO E INVASÃO DE <i>Salmonella enterica</i> SOROVARES ENTERITIDIS E TYPHIMURIUM <i>IN VITRO</i> .....	40
5.1 INTRODUÇÃO .....	41
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
5.2.1 Produção e avaliação de anticorpos antiema através da inoculação de igy purificada em coelhos e caprino .....	43
5.2.2 Extração de IgY das gemas de ovos .....	43
5.2.3 Purificação de anticorpos igy em coluna de afinidade HiTrap™ IgY (GE®).....	43

5.2.4	Quantificação de IgY .....	44
5.2.5	Imunização de caprino e coelhos com IgY purificada.....	44
5.2.6	Titulação de IgG anti-IgY de ema por ELISA.....	45
5.2.7	Purificação de anticorpos totais do soro hiperimune de coelho e caprino.....	46
5.2.8	Purificação de IgG anti-IgY de ema de soro hiperimune utilizando coluna de afinidade HiTrap™ .....	46
5.2.9	Biotinilação de anticorpos igg de coelho e caprino anti-IgY de ema.....	47
5.2.10	Avaliação da especificidade da IgG marcada com biotina anti-igy de ema frente a anticorpos de diferentes espécies animais .....	47
5.2.11	Produção de IgY anti proteínas de <i>Salmonella entérica</i> em emas e galinhas .....	48
5.2.11.1	Produção de proteínas recombinantes obtida pela clonagem dos genes <i>inva</i> , <i>SefA</i> e <i>FliB</i> de <i>Salmonella enteritidis</i> PT4.....	48
5.2.11.1.1	Seleção do gene de <i>Salmonella enteritidis</i> .....	48
5.2.11.1.2	Cepa de <i>Salmonella Enteritidis</i> .....	48
5.2.11.1.3	Extração do DNA genômico de <i>Salmonella Enteritidis</i> .....	49
5.2.11.1.4	Clonagem dos gene <i>fimA</i> , <i>fliB</i> e <i>sefA</i> .....	49
5.2.11.1.5	Ensaio de expressão e purificação das proteínas recombinantes <i>FimA<sub>rec</sub></i> , <i>recFliB</i> e <i>SefA<sub>rec</sub></i> .	50
5.2.11.1.6	Imunização das aves com proteína a recombinante <i>recFliB</i> .....	51
5.2.11.1.7	Extração e purificação de IgY das gemas de ovos.....	51
5.2.11.1.8	Titulação de IgY pré e pós-imune por ELISA.....	52
5.2.11.1.9	Western blot .....	52
5.2.12	Avaliação da ação de anticorpos IgY anti- <i>recFliB</i> sobre o crescimento, adesão e invasão de cepas de <i>Salmonella in vitro</i> .....	53
5.2.12.1	Cepas bacterianas e condições de crescimento .....	53
5.2.12.2	Cultivo celular .....	53
5.2.12.3	Teste de inibição do crescimento .....	54
5.2.12.4	Teste de adesão.....	54
5.2.12.5	Teste de invasão .....	55
5.2.13	Análise estatística.....	55
5.2.14	Comitê de Ética.....	56

5.3 RESULTADOS .....	56
5.3.1 Imunizações e bem-estar animal .....	56
5.3.2 produção e avaliação de anticorpos anti-ema através da inoculação de IgY purificada em coelhos e caprino .....	57
5.3.3. Produção de igy anti proteínas de <i>salmonella entérica</i> em emas e galinhas .....	59
5.3.3.1 Os antígenos .....	59
5.3.3.1 Concentração IgY .....	62
5.3.3.2 Western blot .....	63
5.3.3.3 ELISA .....	64
5.3.4 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti - recFljB sobre o crescimento, adesão e invasão de cepas de <i>salmonella in vitro</i> .....	65
5.3.4.1 Inibição do crescimento .....	65
5.3.4.2 Teste de adesão .....	70
5.3.4.3 Teste de invasão .....	72
5.4 DISCUSSÃO .....	74
5.5 CONCLUSÕES .....	80
REFERÊNCIAS .....	81
6 - CAPÍTULO 2 .....	91
INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA POTENCIALMENTE PATOGÊNICA DE <i>Rhea americana</i> DE CATIVEIRO	91
6.1 INTRODUÇÃO .....	92
6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	93
6.2.1 Local e coleta de amostras .....	93
6.2.2 Isolamento e identificação bacteriana .....	93
6.2.2.1 Gram-negativas .....	93
6.2.2.2 Microrganismos Gram-positivos .....	95
6.2.2.3 Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos .....	95
6.2.2.4 Investigação molecular .....	96
6.2.2.4.1 Extração e amplificação do DNA de <i>E.coli</i> .....	97

6.2.2.4.2 Extração e amplificação do DNA de <i>Staphylococcus</i> spp .....	98
6.3 RESULTADOS .....	99
6.4 DISCUSSÃO .....	104
7 - ARTIGO .....	109
Identification of bla <sub>CTM-X</sub> , bla <sub>SHV</sub> , and bla <sub>TEM</sub> genes in ESBL-positive <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp. isolated from Greater Rhea ( <i>Rhea americana</i> ) in Brazil.....	110
8- CONCLUSÃO .....	126
REFERENCIAS .....	127

## 1. INTRODUÇÃO

Emas (*Rhea americana*) são aves típicas da fauna brasileira e da América do Sul, habitam regiões de campos e savanas. Pertencem à Ordem Rheiforme, Família Rheidae e ao Gênero *Rhea*. No Brasil, as espécies mais frequentes são a *Rhea americana americana*, encontrada no norte do Paraná, regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e a *Rhea americana intermedia*, encontrada nos três estados da região Sul. É uma ave pernalta de grande porte, considerada a maior ave brasileira, pertencente ao grupo das ratitas - não voadoras. É um animal controlado e protegido por órgão governamental, que define e regulariza as normas para criação, além de proibir a caça.

Diversos zoológicos, parques de conservação e centros de reabilitação da vida selvagem têm demonstrado preocupação em relação à presença e ao grau de ocorrência de doenças entre os animais. Nesses ambientes, devido à concentração de diferentes espécies animais em espaços restritos, associado ao estresse do cativeiro e ao contato direto com o homem, torna-se susceptível à infecção por diferentes patógenos.

O estudo da microbiota bacteriana de aves silvestres clinicamente saudáveis é um passo importante para a compreensão da epidemiologia das doenças bacterianas que podem afetar as suas populações e espécies semelhantes. O conhecimento da microbiota bacteriana de animais silvestres também pode ser de interesse para a saúde pública, uma vez que várias bactérias potencialmente patogênicas já foram isoladas de aves silvestres, como *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Salmonella* spp. Diante desse contexto, em aves silvestres, a bactérias patogênicas pode ser uma ameaça à conservação da diversidade biológica, acarretando grande ameaça à avifauna, embora alguns autores enfatizem que na maioria dos casos as aves sejam portadoras sadias.

Até o momento, há poucos estudos e, conseqüentemente, pouca literatura, sobre a situação sanitária dos plantéis de emas no território nacional. Em emas de abatedouros no Rio Grande do Sul, isolou-se *Salmonella* spp. em 94,2% delas.

Atualmente existem algumas linhas de pesquisas tentando estabelecer novos procedimentos terapêuticos e preventivos, entre elas a produção de anticorpos IgY como ferramenta no combate às infecções causadas por *Salmonella* e outros microrganismos.

O uso de proteínas recombinantes como ferramenta importante para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, para doenças que acometem os animais e humanos, tem sido alvo de vários estudos. Uma pesquisa sobre o desenvolvimento de IgY, desenvolvida por nosso grupo, mostrou que os anticorpos IgY policlonais obtidos a partir da inoculação de proteínas recombinantes SECreC, 5 RAPrec de *Staphylococcus aureus* e, EspBrec e BfpArec de *E. coli* em avestruzes, apresentaram propriedades antimicrobianas capazes de inibir o crescimento de diferentes cepas dessas bactérias, bem como foram eficazes em reconhecer as proteínas e testes imunológicos. Esses fatos significaram um importante passo para o interesse em desenvolver imunoglobulinas a partir de emas, devido à 10 necessidade de maior controle sobre possíveis ocorrências de doenças entre animais de vida livre e de plantéis mantidos em cativeiro, tanto em criações particulares que visam à preservação da espécie, como em zoológicos.

15

20

25

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A EMA

5 Segundo Giannoni (1996), as ratitas são as maiores aves do continente americano. No Brasil ocorrem três subespécies ou “raças geográficas”. *Rhea americana americana* é comum nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e norte do Paraná, *Rhea americana intermedia* é encontrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e sul do Paraná e *Rhea americana albescens* é nativa do sudoeste do Mato Grosso do Sul. As ratitas, grupo ao qual pertencem as emas são consideradas  
10 aves primitivas do ponto de vista filogenético e constitui-se em um grupo altamente especializado (SICK, 2001).

São aves corredoras, que apresentam características anatômicas e fisiológicas que as diferem do grupo das carinadas (aves que voam) pela ausência de quilha no osso esterno, do músculo peitoral, músculo das asas atrofiado e glândula uropigiana o que as impede de voar. Outra diferença é a  
15 separação de fezes e urina na cloaca (SICK, 1986). Seu corpo é ovoide, com região posterior cônica (DANI *et al.*, 1993). Normalmente o macho é maior que a fêmea, e tem coloração negra mais acentuada (BRESSAN, 2005).

A ema vive normalmente em grupos com aproximadamente 40 indivíduos, apresenta hábitos diurnos (PEREIRA, F., 2008). É onívora, sua alimentação é composta basicamente de vegetais, insetos  
20 e pequenos invertebrados, e realiza também a coprofagia (DANI *et al.*, 1993).

Essas aves possuem regressão para voo apesar de possuírem asas bastante grandes, mas essa limitação é compensada pela grande capacidade para correr, podendo alcançar até 60 km/h. Suas grandes asas são usadas para manter o contrapeso durante a corrida e no ato do acasalamento. São usadas também para a proteção dos filhotes e como objeto de exibicionismo na conquista da  
25 fêmea (SILVA, 2001). As emas são normalmente mansas e curiosas, porém, quando assustadas, correm com passadas longas em zigue-zagues, mostrando assim a utilidade de asas longas para uma ave que não voa (SICK, 1986).

Por sua beleza, caráter exótico e comportamento curioso, a ema oferece a possibilidade de ser criada como um animal de estimação e ornamental. É capaz de ajudar no controle de pragas em  
30 pastagens e tem facilidade de adaptação na presença de outros animais como bovinos, ovinos e

caprinos ou até mesmo outros animais silvestres como capivara, pacas e veados. Tais características são interessantes para a criação em fazendas (GIANNONI, 1996).

Quanto à reprodução, a ema é poligínica ou poliândrica, ou seja, o macho copula com várias fêmeas assim como a fêmea copula com vários machos (PEREIRA, F., 2008). De acordo com Silva (2001), a atividade reprodutiva das emas é variável segundo a região geográfica. Essa variação é observada no Brasil devido à grande extensão territorial, a reprodução começa na primavera e vai até meados de Janeiro nas regiões sudeste e sul, enquanto que na Bahia e Mato Grosso (região do Pantanal) ocorre entre os meses de julho e setembro. No Rio Grande do Norte a ema se reproduz durante todo o ano.

Segundo Giannoni (1996), a ema pode atingir a maturidade sexual entre 10 e 24 meses de idade, sendo mais recomendado que o primeiro acasalamento ocorra a partir do segundo ano. Nesse período iniciam-se as lutas pela dominância do grupo. Essas lutas ocorrem apenas entre machos e são muito importantes, pois através delas são geradas cargas hormonais que influenciam na fertilidade. Famílias onde existe apenas um macho podem ter a fertilidade afetada por falta das brigas (SILVA, 2001).

São formados haréns com um ou dois machos dominantes para cada cinco a oito fêmeas. O mais interessante do comportamento reprodutivo das emas é o papel desempenhado pelo macho, pois ele faz a corte, constrói o ninho, choca os ovos e cuida dos filhotes, enquanto a fêmea apenas realiza a cópula e põe os ovos (DANI *et al.*, 1993).

As fêmeas iniciam a postura 25 dias após a cópula, põe os ovos em volta do ninho e o macho que se encarrega de arrastá-los para dentro até que seja atingida uma quantidade satisfatória. Após dois ou três dias do início da postura os machos iniciam a incubação, podendo chocar de 10 a 60 ovos, sendo em média dezoito ovos por ninho (BRESSAN, 2005). Uma fêmea é capaz de botar de 10 a 18 ovos em um período, com um intervalo de dois a três dias entre as posturas (SICK, 1986) e realizam várias posturas para vários machos em uma mesma estação, botando em média de 25 a 40 ovos no total (SILVA, 2001).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA classifica as emas como aves silvestres, sendo sua criação e comércio de carne e subprodutos controlados por esse órgão, ficando o abate desses animais restrito a abatedouros com serviço de inspeção. Além disso, é importante destacar que a caça dessas aves é proibida. Em 2012, a *Rhea americana* foi classificada pela *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources-*

IUCN, como espécie quase ameaçada de extinção, com tendência de diminuição da população em localidades onde há avanço humano em áreas naturais (IUCN, 2012).

Há uma carência de estudos sobre os aspectos sanitários de emas mantidas em criatórios. Desconhecendo-se, assim, quais microrganismos estão presentes nessas aves e se o contato com esses animais facilita a disseminação de agentes infecciosos para novos hospedeiros e ambientes. Portanto, as emas, a exemplo de outros animais silvestres, podem aumentar a dispersão geográfica de patógenos tanto para o homem quanto para outros animais (NUNES, 2007; SILVA, 2010). Com isso, faz-se necessário que animais silvestres com produção em cativeiro sejam investigados quanto a sua importância como reservatórios ou portadores de microrganismos patogênicos, mesmo na ausência de sinais clínicos de infecção estabelecida (ACHA & SZYFRES, 2003).

É comum o isolamento de microrganismos potencialmente patogênicos a animais e humanos, como parte da microbiota do trato gastrointestinal de diversas espécies de aves, no que se incluem também as emas (BRILHANTE *et al.*, 2013).

## 2.2 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. O gênero é constituído por duas espécies, a *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, sendo as demais classificadas como sorovares ou subtipos, tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (GRIMONT & WEILL, 2007). A *S. enterica* subsp. *enterica* é responsável por 99% dos isolamentos, usualmente de animais de sangue quente. *S. bongori* foi considerada uma espécie diferente e tem poucos sorovares, normalmente não causa doença em humanos, sendo mais associada a doenças em animais de sangue frio (CHAN *et al.* 2003).

A salmonelose pode acometer animais domésticos, silvestres e humanos (SMITH *et al.* 2002) e sua forma de transmissão mais comum é pela via fecal-oral que pode ocorrer por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (ACHA e SZYFRES 1886, SMITH *et al.* 2002) ou por contato direto com animais infectados. Outras vias de transmissão também foram relatadas como, por exemplo, o contato com superfícies contaminadas com matéria orgânica, ou com solos úmidos, água, fezes onde o agente pode sobreviver por longos períodos (CARVALHO, 2006).

Smith *et al.* (2002) relataram que a prevalência de *Salmonella* spp. em populações de animais silvestres é desconhecida e provavelmente variável. Melville *et al.* (2014) citaram as aves silvestres como tendo um papel importante na cadeia epidemiológica da doença, sendo algumas delas bastantes suscetíveis à morte por salmonelose como é o caso de pequenos Passeriformes. Estes mesmos  
5 autores enfatizaram que evidências epidemiológicas e bacteriológicas indicaram que esses animais podem transmitir a bactéria para humanos e animais de produção. Da mesma forma Smith *et al.* (2002) sugeriram o contato com aves de vida livre como responsável pela contaminação de carcaças de frango.

A situação inversa também foi verificada, os autores responsabilizaram o homem e seus  
10 animais domésticos de criação como responsáveis pela disseminação desse patógeno para a fauna silvestre (PENNYCOTT *et al.* 2006), sugerindo a possibilidade de haver um elo entre as cadeias epidemiológicas domésticas e silvestres da salmonelose, além de outras enfermidades bacterianas.

De todos os sorovares de *Salmonella*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são as mais predominantes e têm sido os principais responsáveis pela salmonelose humana por vários anos. Além  
15 disso, esses dois sorovares são muito importantes porque podem colonizar qualquer espécie, inclusive aves. Nas aves, essas bactérias podem persistir no trato digestório por muitos meses sem evidências de sinais clínicos (BARROW *et al.*, 1987).

### 2.2.1 *Samonella* e aves silvestres

20

Os animais silvestres, particularmente os mantidos em cativeiro, estão em contato constante com bactérias tanto no meio ambiente como em seu organismo. O conhecimento da microbiota de aves silvestres assintomáticas é muito importante para a compreensão da epidemiologia das infecções bacterianas que podem acometer esses animais e pode ser de interesse para a saúde pública  
25 (REFSUM *et al.*, 2002; DOBBIN *et al.*, 2005). Bactérias patogênicas já foram isoladas de aves silvestres, entre estas algumas com potencial zoonótico como *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp. e *E. rhusiopathiae* (LILLEHAUG *et al.*, 2005, GOMES *et al.*, 2013 ).

Na atividade de avicultura, o Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, com  
30 produção anual superior a 3,99 milhões de toneladas (ABPA, 2014). Tendo em vista a necessidade da sanidade dos plantéis e da importância econômica da produção de frango de corte que colocou o Brasil em posição destacada, o MAPA instituiu em 1994 o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)

que indica a realização de suabe cloacal para a monitoria de *Salmonella* spp. em aves domésticas, ornamentais e silvestres, incluindo as ratitas (BRASIL, 2003).

5 A salmonelose é uma importante doença aviária devido a sua elevada letalidade e potencial zoonótico. Corrêa (2012), ao investigar a presença de enterobacteriáceas em suabes cloacais de 36 psittacídeos oriundos de criadouro conservacionista no sul do Brasil, encontrou *Salmonella* spp em 6,6% das aves. Em 2010, um estudo com 51 aves de dez espécies diferentes de cracídeos mantidos em cativeiros no estado do Rio Grande do Sul isolou a partir de suabes cloacais *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., porém todas as amostras foram negativas para o isolamento de *Salmonella* spp.  
10 (SANTOS *et al.*, 2010).

Com o objetivo de avaliar a presença de *Salmonella* spp. em aves silvestres mantidas em cativeiro no zoológico de Sorocaba-SP, Schubert (2008) analisou 100 amostras de fezes de diferentes aves e identificou 11% de amostras positivas.

15

Essas e outras pesquisas indicam um risco à saúde pública, principalmente para os profissionais do zoológico e cuidadores dos criatórios conservacionistas que trabalham diretamente com esses animais. É necessário ressaltar a importância da criação de estratégias de vigilância epidemiológica voltadas para a prevenção, controle e monitoramento de potenciais reservatórios de  
20 agentes etiológicos de doenças infecciosas e parasitárias no ambiente dos zoológicos (LIMA, 2012).

Até o momento, não há estudos sobre a situação sanitária dos plantéis de emas no território nacional, embora conste no regulamento do PNSA a necessidade do monitoramento constante das doenças que colocam em risco o plantel de aves de produção e silvestres ou a saúde pública, no que a  
25 Salmonelose se destaca entre as três principais doenças de interesse comercial (BRASIL, 2003).

### 2.2.2 *Salmonella* em Emas

Até o momento há pouca bibliografia na área de sanidade de emas. Pereira (2007a) e Pereira  
30 *et al.* (2007b), em abatedouros do Rio Grande do Sul, isolaram *Salmonella* spp. em 94,2% de emas, sendo 85,7% em amostras de fígado, 60% em conteúdo cecal e 15,71% em suabe cloacal. Das 114 linhagens de *Salmonella* isoladas, identificaram-se 16,6% como *S. enterica* subsp. *enterica* rugosa, 35,9% como *S. Typhimurium*, 46,5% como *S. Newport* e uma amostra (0,9%) como *S. Anatum*

(PEREIRA, R., 2008). Das *S. Typhimurium* isoladas, a autora também avaliou a resistência a antibióticos e identificou resistência contra sulfonamida (73,44%), ácido nalidíxico (1,56%) e cefaclor (1,56%).

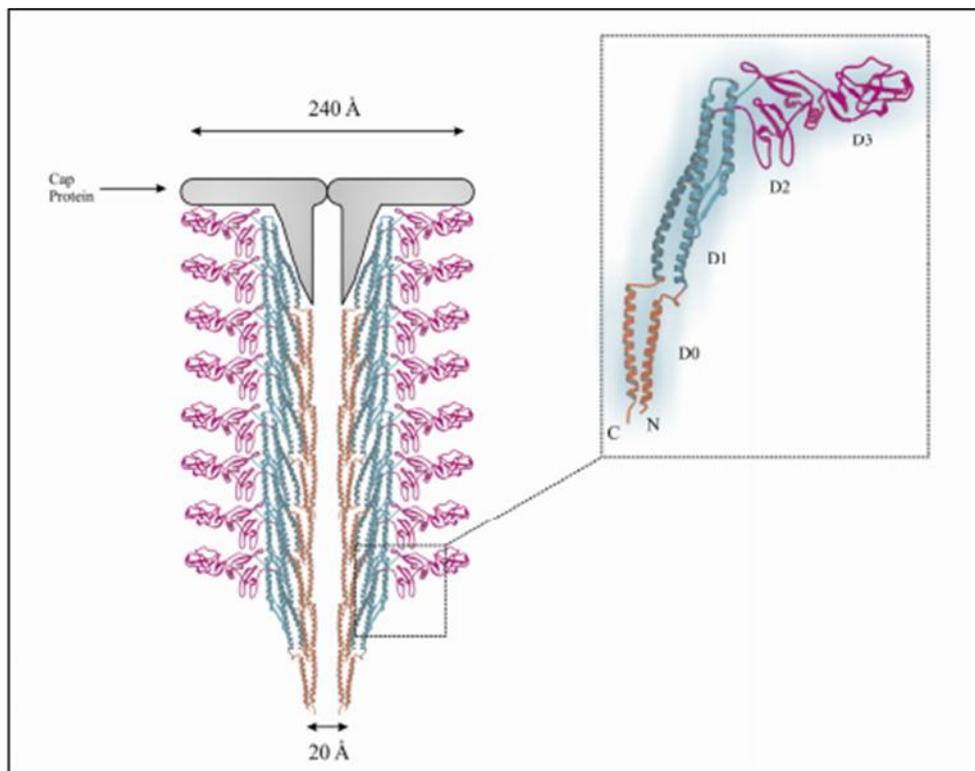
Em 2008, Martini descreveu um caso de Salmonelose septicêmica em uma ema necropsiada de um zoológico de Guarulhos, SP. Foi realizado isolamento bacteriano padrão em órgãos e identificação sorológica com soro anti-Salmonela polivalente. A autora relata que o animal compartilhava o mesmo espaço com jabutis que um ano antes sofreram com um surto de salmonelose com elevada letalidade. Também ressaltou a presença de pombos no local como potencial fonte de infecção.

Diarreia é o sinal clínico mais comum em filhotes de emas. Muitos pintinhos têm diarreia quando o saco vitelino é absorvido e o pintinho começa a comer bem, em torno de 8-12 dias de idade. Causas bacterianas de diarreia incluem *E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum*, *Mycobacterium* spp. (adultos), *Streptococcus* spp., e *Staphylococcus* spp. (TULLY Jr, 2014).

### 2.3 FLAGELO

O flagelo bacteriano é uma estrutura complexa que permite o movimento e a sobrevivência das bactérias. Os flagelos são estruturas vitais para alguns agentes patogênicos, estão relacionados à promoção da adesão celular e invasão bacteriana (RAMOS *et al.*, 2004). O flagelo bacteriano é composto por três partes distintas: o corpo basal (força motriz), o gancho (funciona como uma junção universal) e o filamento (o filamento longo tubular helicoidal). O filamento flagelar é composto de uma única proteína, a flagelina. Cerca de 20.000 - 100.000 subunidades de flagelina são polimerizadas com o auxílio de uma proteína chaperona para formar o eixo longo do filamento na superfície da célula que pode estender-se em até dez vezes o tamanho da própria célula bacteriana (YONEKURA *et al.*, 2002; ADKINS *et al.*, 2006. ). No caso de *S. Typhimurium*, a flagelina FliC tem uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa e mostra quatro domínios estruturais. Os domínios helicoidais (D0 D1) e terminais estão localizados no interior do filamento, são necessários para a montagem de filamentos e são altamente conservados entre diferentes espécies bacterianas. Os domínios D2 e D3 são expostos na superfície do filamento e mostram a grande diversidade de sequência de aminoácidos entre diferentes espécies bacterianas.

Além disso, a flagelina (Figura 1a) é também um ativador potente da resposta imune inata. Os seus efeitos são mediados por ligação específica do domínio D1 (em destaque na figura) para receptor Toll-like 5 (TLR5) (SMITH, 2003). Nos mamíferos, essa interação desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas por células como macrófagos e células dendríticas, que conduz a uma ativação mais eficiente de respostas imunitárias adaptativas (DIDIERLAURENT *et al.*, 2004). Na realidade, a flagelina de *Salmonella*, tanto como a proteína nativa ou recombinante, tem sido intensivamente estudada como um adjuvante em formulações de diferentes vacinas quer misturadas ou geneticamente fusionadas com antígenos de proteínas-alvo (GERWITZ *et al.*, 2001a; GERWITZ *et al.*, 2001b; HAYASHI *et al.*, 2001; AMARRA *et al.*, 2001; LIAUDET *et al.*, 2002; HULEATT *et al.*, 2007; UEMATSU *et al.*, 2008; BARGIERI *et al.*, 2008; BARGIERI *et al.*, 2010; BRAGA *et al.*, 2010). Flagelina de *Salmonella* foi testada com sucesso como um protetor celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, contra os efeitos tóxicos de procedimentos químicos e radiológicos vulgarmente utilizados no tratamento de cancro (RAMOS *et al.*, 2004; WANG, B. *et al.*, 2008).



15

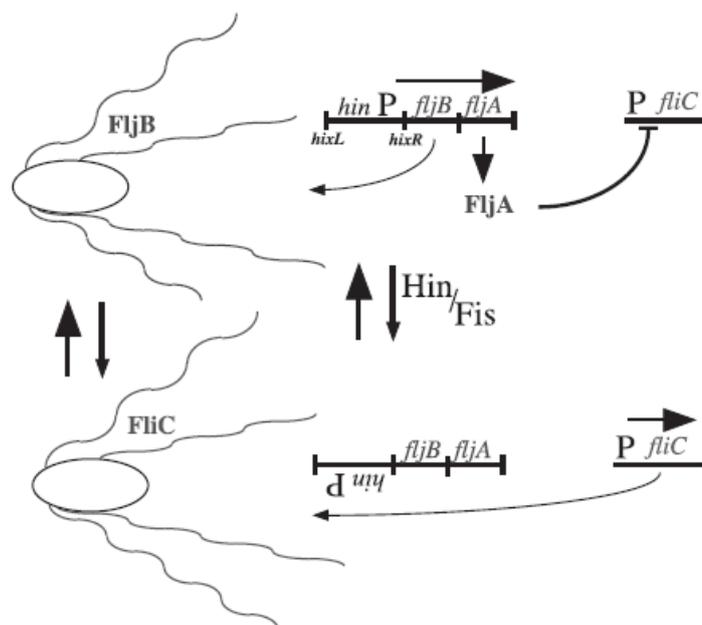
FIGURA 1A. Vista longitudinal esquemática do flagelo de *S. Typhimurium* e do monômero de flagelina. Os domínios estruturais da flagelina são representados por cores como se segue: as cadeias terminais  $\alpha$ -hélice (D0, marrom), as cadeias centrais  $\alpha$ -hélice (D1, azul), e as regiões hipervariáveis lâmina  $\beta$  (D2 e D3, rosa). As regiões  $\alpha$ -hélice (marrom e azul) têm função estrutural e de motilidade e estão internalizadas no núcleo do flagelo (Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2011).

20

### 2.3.1 FljB – Flagelina de fase 2

Em muitos sorovares de *Salmonella*, dois ou mais tipos distintos de flagelina (geralmente FliC e FljB) são expressos alternadamente, esse mecanismo é conhecido como variação de fase flagelar. Um dos primeiros exemplos dessa mudança é a variação de fase flagelar de *Salmonella* Typhimurium. A expressão alternada dos dois antígenos flagelina (FljB e FliC) é obtida invertendo uma região cromossômica que inclui o promotor para um pequeno operon, que codifica um tipo de flagelina (FljB), e uma proteína (FljA), que inibe a síntese do outro tipo (FliC), codificada por um gene não ligado (ASTEN & DIJK, 2005).

A variação da flagelina é reversível e controlada pela inversão de um fragmento de DNA de 996 nucleotídeos, denominado fragmento H, o qual contém um promotor para o gene *fljB*. O segmento H é cercado por sequências repetidas de 26 nucleotídeos, *hixL* e *hixR*. Essa recombinação é mediada pela DNA invertase (Hin), cujos genes estão localizados dentro do segmento H. Quando o segmento H está orientado no sentido *on*, tanto *fljB* como o *fljA* são transcritos, resultando na síntese da flagelina de fase 2 FljB. Quando o segmento H está na orientação *off*, o *fljB* e o *fliA* não são expressos, resultando na síntese da flagelina de fase 1 – FliC (Figura 1b) (ALDRIDGE *et al.*, 2006). Esse mecanismo de variação de fase é um recurso explorado pela maioria das *Salmonellas* flageladas para escapar do sistema de defesa do hospedeiro (ASTEN & DIJK, 2005; NEMPONT *et al.* 2008).



## 2.4 IMUNOGLOBULINA Y (IgY)

A IgY é uma imunoglobulina produzida por aves, répteis e anfíbios e são transferidos da fêmea para a gema do ovo conferindo uma imunidade passiva aos embriões e neonatos (ZHANG, 2003). Em condições naturais, a IgY no soro das galinhas poedeiras é transferida em grandes quantidades na gema do ovo, a fim de proteger o desenvolvimento do embrião de potenciais patógenos (JANSON *et al.*, 1995).

A utilização de galinhas para a produção de anticorpos policlonais proporciona muitas vantagens sobre os métodos de produção utilizando mamíferos (Quadro 1) (SCHADE *et al.*, 2005).

Quadro 1. Comparação das características de IgG de mamíferos e IgY de galinha.

Parâmetros	IgG de mamíferos	IgY de galinha
Coleta de amostra	Invasiva	Não invasiva
Pesquisa de anticorpos (atc)	Soro sanguíneo	Gema de ovo
Quantidade de atc	200mg/40ml sangue	50–100 mg IgY/ovo
Frequência de coleta	A cada duas semanas	Diariamente
Quantidade de atc/ano	5200 mg	22500 mg
Quantidade de atc específico	Aprox. 5%	2-10%
Proteína de ligação A/G	Sim	Não
Interferência com IgG de mamífero	Sim	Não
Ativação complemento de mamífero	Sim	Não

Adaptado de Schade *et al.* (2005).

### 2.4.1 Estrutura e função da IgY

Os anticorpos IgY têm um ancestral comum com a IgG, IgE e IgA de mamíferos (WARR *et al.*, 1995). Embora a IgY de galinha seja um equivalente funcional de IgG de mamíferos, existem algumas diferenças na sua estrutura. A estrutura geral da molécula IgY é a mesma que a molécula de IgG com duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), mas as cadeias IgY têm uma massa molecular de 180 kDa que é maior do que a de IgG de mamíferos (150 kDa) (Figura 2). A massa molecular (67-70 kDa) da cadeia H da IgY é maior do que a cadeia H de mamíferos (50 kDa). A maior massa molecular de IgY é devido a um maior número de domínios constantes da cadeia pesada e cadeias de

carboidratos (WARR *et al.*, 1995). IgG tem 3 regiões C (C $\gamma$ 1-C $\gamma$ 3), enquanto IgY tem 4 regiões C (C $\gamma$ 1-C $\gamma$ 4), e a presença de uma região C adicional com suas duas cadeias de carboidratos correspondentes, logicamente, resulta em uma maior massa molecular de IgY em comparação com IgG.

- 5 Outras diferenças na estrutura incluem o fato de que a região “hinge” de IgY é muito menos flexível em comparação com IgG de mamíferos. Davalos-Pantoja *et al.* (2000) relataram que IgY é uma molécula mais hidrofóbica do que a IgG. Finalmente, IgY tem um ponto isoelétrico de pH 5,7-7,6, enquanto que a IgG se situa entre 6,1 e 8,5 (DAVALOS-PANTOJA *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2001).

10

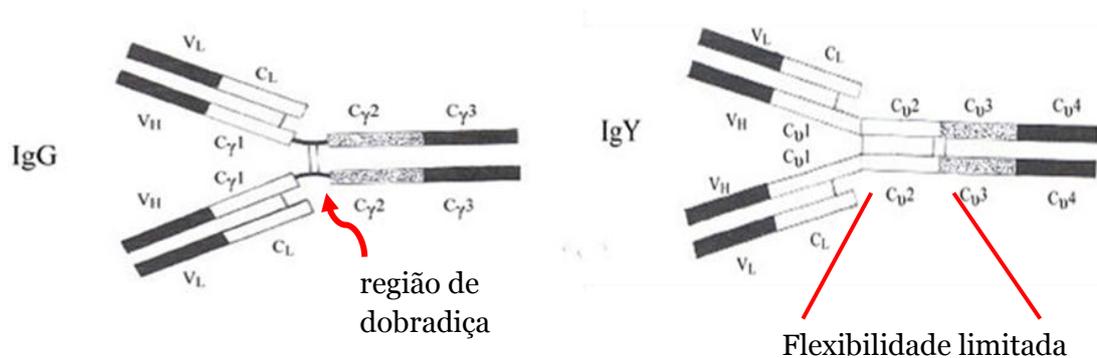


FIGURA 2. Estrutura de IgG e IgY (XU, 2011).

- 15 Não existe reação cruzada imunológica entre a IgY de galinha e a IgG de mamíferos, por isso as aves são elegíveis para a produção de anticorpos contra proteínas de mamíferos. Esses anticorpos não se ligam a receptores Fc dos anticorpos de mamíferos (LARSSON *et al.*, 1992), não reagem com fator reumatoide e nem com anticorpos IgG de humanos anti-camundongo e nem com a proteína A de *Staphylococcus* e G de *Streptococcus* (AKITA & NAKAI, 1993). Anticorpos de galinhas se ligam a mais
- 20 epítomos em uma proteína de mamífero do que o anticorpo correspondente em mamíferos (CHACANA *et al.*, 2004). A IgY também pode ser submetida aos mesmos processos de marcação de anticorpos que os anticorpos de mamíferos, tais como os descritos com biotina, fluoresceína e peroxidase (CARLANDER *et al.*, 1999).

## 25 2.4.2 Modo de ação

Os mecanismos exatos pelos quais IgY neutraliza a atividade de patógenos não foram determinadas. No entanto, vários mecanismos têm sido propostos para expressar como IgY específica neutraliza a atividade patogênica.

Tsubokura *et al.* (1997) sugeriram que a inibição do crescimento bacteriano ou colonização observado como um resultado do tratamento com IgY pode ser o resultado de aglutinação bacteriana, causando uma redução na taxa de UFC com efeitos diretos sobre as bactérias. Embora aglutinação possa ser um mediador de inibição de crescimento, é improvável que seja o mediador mais importante, porque a ligação cruzada de bactérias é evitada pela ligação estereoquímica dos dois braços de IgY.

Vários estudos *in vitro* sugeriram que a inibição da aderência é o mecanismo dominante pelo qual a IgY específica neutraliza a atividade do patógeno (JIN, L.Z., *et al.* 1998; LEE, E., *et al.* 2002). Jin, L.Z., *et al.* (1998) mostraram que a IgY atua prevenindo a aderência de *E. coli* K88 ao muco intestinal de leitões. Componentes particulares expostos na superfície de bactérias Gram-negativas, tais como proteínas da membrana externa, lipopolissacarídeos, fímbrias, e flagelos, que são fatores cruciais para a colonização bacteriana, podem ser reconhecidos e ligados pelo anticorpo policlonal relacionado, tais como IgY (SIM *et al.*, 2000). Essa ligação pode bloquear ou prejudicar ou até mesmo inibir o crescimento bacteriano.

Nie *et al.* (2004) demonstraram que IgY melhorou a fagocitose de *S. aureus* por neutrófilos. Do mesmo modo, Zhen *et al.* (2008a) mostraram que atividade fagocítica de *E. coli* por macrófagos ou por leucócitos polimorfonucleares aumentou significativamente na presença de IgY. Esses resultados sugerem que IgY aumenta a atividade fagocítica. As alterações estruturais foram observadas na superfície de *S. Typhimurium* (LEE *et al.*, 2002) e *E. coli* O111 (ZHEN *et al.*, 2008a) por ligação com IgY específica. Essas alterações podem ser explicadas pela variação do campo elétrico na superfície da bactéria (LEE *et al.*, 2002), resultando em maior vulnerabilidade das células bacterianas para a fagocitose.

A cápsula de *S. aureus* é o maior fator de virulência envolvido no início da mastite bovina. Wang *et al.* (2011) estudaram a eficácia da IgY contra *S. aureus* encapsulado. Os resultados mostraram que a IgY poderia impedir a internalização do *S. aureus* por células epiteliais mamárias, sugerindo a atividade de neutralização da toxina.

### 2.4.3. Aplicação para a IgY

As possíveis aplicações para o uso de IgY administrada por via oral no controle de infecções entéricas e não entéricas de qualquer origem bacteriana ou viral em humanos e animais têm sido estudadas intensamente e estão resumidas nos quadros 2 e 3.

QUADRO 2: As investigações sobre a utilização de IgY específica para o controle de doenças entéricas.

PATÓGENOS	EFEITOS DA IgY	REFERÊNCIAS
Rotavírus	<p>Proteção os bezerros da diarreia;</p> <p>Prevenção de rotavírus murino em camundongos;</p> <p>Prevenção de gastroenterite por rotavírus humano em camundongos;</p> <p>Prevenção e tratamento de gastroenterite induzida por rotavírus em modelos murinos;</p> <p>Prevenção de infecção por rotavírus <i>in vitro</i>, usando IgY contra proteína de superfície recombinante HRV.</p>	<p>Kuroki <i>et al.</i> (1994)</p> <p>Yolken <i>et al.</i> (1988)</p> <p>Ebina (1996)</p> <p>Hatta <i>et al.</i> (1993)</p> <p>Mine &amp; kovacs-Nolan,(2002)</p>
Coronavírus	Proteção de bezerros contra diarreia induzida por Coronavírus bovina.	Ikemori <i>et al.</i> (1997)
<i>E.coli</i>	<p>Prevenção de infecção por cepas K88+, K99+, 987P+ETEC em leitões;</p> <p>Proteção de bezerros de colibacilose enterica fatal causada pela cepa K99-ETEC;</p> <p>Inibição da adesão de cepas K88-ETEC em leitões;</p> <p>Prevenção da diarreia dos leitões com o uso contínuo de IgY contra cepas patogênicas;</p> <p>Inibição do crescimento de diferentes cepas de <i>E. coli</i> (EPEC) isolados de Avestruzes, utilizando IgY anti-EspBrec e anti-Bfprec de gema de ovos avestruzes.</p> <p>Controle de diarreia dos leitões por ETEC utilizando produto comercial a base de IgY específica anti-proteínas de ETEC.</p>	<p>Yokoyama <i>et al.</i> (1992)</p> <p>Ikemori <i>et al.</i> (1992)</p> <p>Jin, L.Z <i>et al.</i> (1998)</p> <p>Mahdavi <i>et al.</i> (2010)</p> <p>Tobias <i>et al.</i> (2012)</p> <p>Rosa, 2014</p>
<i>Salmonella</i>	<p>Proteção de salmonelose em camundongos imunizados com <i>S. Enteritidis</i> ou <i>S. Typhimurium</i>;</p> <p>Prevenção de salmonelose fatal em bezerros expostos</p>	<p>Yokoyama <i>et al.</i> (1998)</p> <p>Yokoyama <i>et al.</i></p>

	S.Typhimurium ou S. Dublin;  Inibição da adesão de <i>S. Enteritidis</i> em células intestinais humanas.	(1998)  Sugita-konishi <i>et al.</i> (1996)
<i>Yersinia</i>	Proteção contra a infecção por <i>Yersinia</i> em truta-arco-iris.	Lee, S., <i>et al.</i> (2000)
<i>Edwardsiella</i>	Prevenção de eduardisielose em enguias japonesas infectadas por <i>Edwardsiella tarda</i> .	Stevenson <i>et al.</i> (1993)
<i>Staphyococcus</i>	Inibição da produção de enterotoxina A de <i>S. aureus</i> ;  Inibição do crescimento de <i>S aureus</i> de origem bovina e humana utilizando IgY antienterotoxina C e D;  Inibição do crescimento de diferentes cepas de <i>S. aureus</i> isolados de Avestruzes, utilizando IgY anti-SECrec e anti-APrec de gema de ovos avestruzes.	Sugita-Konishi <i>et al.</i> (1996)  Viera-da-Motta <i>et al.</i> (2001)  Tobias <i>et al.</i> (2012)
IBDV	Proteção de galinhas contra Doença de Gumboro;  Tratamento de galinhas com Doença de Gumboro.	Gutierrez <i>et al</i> (1993)  Malik <i>et al</i> (2006)
<i>Pseudomonas</i>	Inibição do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> .	Sugita-Konishi <i>et al.</i> (1996)
CPV-2	Proteção contra infecção pelo vírus da Parvoviose canina.	Nguyen <i>et al.</i> (2006)

Adaptado de MINE e KOVACS-NOLAN (2002).

QUADRO 3: As investigações sobre a utilização de IgY específica no controle de doenças não-entéricas.

Patógenos	Efeitos da IgY	Referências
<i>E. coli</i>	Maior conversão alimentar em galinhas utilizando IgY produzidas contra a cepa <i>E. coli</i> O78:K80.  Tratamento de bovinos com mastite	Ribeiro <i>et al.</i> (2005, 2007)  Zhen <i>et al.</i> (2008a)
<i>Streptococcus mutans</i>	Proteção da cárie dental induzida por <i>Streptococcus mutans</i> em ratos.	Hamada <i>et al.</i> (1991)

Veneno de Cobra	Neutralização de componentes tóxico e letais de venenos	Meenatchisundaram <i>et al.</i> (2008)
SARS Coronavírus	Prevenção da infecção por SARS – Coronavírus <i>in vitro</i> .	Fu <i>et al.</i> (2006)
Vírus da Influenza aviária	Proteção de pássaros contra o Vírus da Influenza subtipo H9N2  Proteção contra influência aviária H5N1	Rahimi <i>et al.</i> (2007)  Kamiyama <i>et al.</i> (2011)
LPS	Proteção contra efeitos da LPS de bactéria Gram-negativas em camundongos	Ma & zhang, 2010
HAV	Proteção contra o vírus da Hepatite A	De Paula, <i>et al.</i> (2011)
<i>Candida albicans</i>	Inibição do crescimento da <i>Candida albicans</i>	Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>Staphyococcus</i>	Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> por IgY de galinha  Tratamento de bovinos com mastite causada por <i>S. aureus</i>	Guimarães <i>et al.</i> (2009)  Zhen <i>et al.</i> (2008b)
<i>Helicobacter pylori</i>	Tratamento da infecção por <i>Helicobacter pylori</i> em pacientes humanos utilizando bebida láctea contendo IgY específica.	Horie <i>et al.</i> (2004)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Inibição do crescimento <i>in vitro</i> e em amostras de alimentos	Sui <i>et al.</i> (2011)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Proteção de septicemia em <i>Carassius auratus Gibelio</i> causada por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Jin, L., <i>et al.</i> (2013)
<i>Trypanosoma evansi</i>	Ao ser administrado com fins terapêuticos, em <i>Rattus norvegicus</i> , reforça o sistema imunológico e prolonga a sobrevivência.	Sampaio, 2014

Adaptado de XU *et al.* (2011).

### 3 JUSTIFICATIVA

As emas são espécies nativas do Brasil, logo a preservação das espécies animais brasileiras e o controle de doenças infecto-contagiosas de diferentes origens passam pela necessidade de criação de ferramentas específicas para tais fins. No primeiro momento, o desenvolvimento dos anticorpos IgY em emas e IgG antiemas em mamíferos, essa proposta apresenta um produto para o mercado nacional como um importante aliado no diagnóstico de doenças causadas por vários patógenos, além do monitoramento da entrada e saída desses animais, tanto dentro do país como na importação e exportação dos mesmos. A produção de anticorpos IgY em emas imunizadas com antígenos recombinantes trata-se de tema inédito e que poderá fornecer novas informações sobre a qualidade e quantidade desses reagentes para uso no diagnóstico contra patógenos causadores de enfermidades nos âmbitos veterinário e humano. Tendo em vista que existe a exploração e a comercialização de emas no Brasil, é imprescindível o esclarecimento dos principais microrganismos que compõem a biota intestinal desses animais e sua resistência a drogas, que podem representar risco à saúde de humanos. Ainda há o interesse em conhecer a microbiota intestinal, em vista da escassez de conhecimento/ publicações/pesquisas nessa área e nessa espécie.

20

25

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- 5 Produzir imunoferramenta para o diagnóstico de salmonelose em ema (*Rhea americana*).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 10
- Purificar IgY de gema de ovos de ema utilizando coluna de afinidade HiTrap™IgY(GE) e produzir IgG anti-IgY de ema em coelhos e caprino;
  - Comparar os dois modelos mamíferos (coelho e cabra) como forma de obtenção de ferramenta mais específica;
  - Produzir proteína recombinante obtida a partir da clonagem do gene *fljB* de *S. Enteritidis* em sistema procaríoto;
- 15
- Purificar a proteína recombinante;
  - Produzir anticorpos IgY anti-recFliJ em emas (*Rhea americana*) e galinhas;
  - Avaliar a especificidade dos atc IgY anti-recFliJ;
  - Avaliar a ação de anticorpos IgY anti-recFliJ sobre o crescimento cepas de *S. Typhimurium* e *Enteritidis*;
- 20
- Avaliar o efeito de anticorpos IgY anti-recFliJ na adesão e invasão de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* em cultura de células de cólon humano (Caco-2 e HT-29);
  - Isolar microrganismos da cloaca e orofaringe de emas e estudar o perfil de resistência frente a diferentes drogas;
  - Investigar a presença de genes de patogenicidade nos isolados, por PCR.

## 5 - CAPÍTULO 1

5

**EFEITO DA IgY ANTI-recFljB de *S. Enteritidis* PT4 PRODUZIDA EM OVOS DE EMA E GALINHAS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO, ADESÃO E INVASÃO DE *S. Enteritidis* E *Typhimurium* *IN VITRO***

10



15

## 5.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* sendo esta última classificada em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*,  
5 *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GRIMONT & WEILL, 2007). Em muitos sorovares de *Salmonella*, dois ou mais tipos distintos de flagelina (geralmente FliC e FljB) são expressos alternadamente, cujo mecanismo é conhecido como variação de fase flagelar. Um dos primeiros exemplos dessa mudança é a variação de fase flagelar de *Salmonella* Typhimurium. A expressão alternada dos dois antígenos flagelina (FljB e FliC) é obtida invertendo uma região cromossômica que inclui o promotor para um  
10 pequeno operon (*hin*) que codifica um tipo de flagelina (FljB) e uma proteína (FljA) que, por sua vez, inibe a síntese de outro tipo (FliC) (ASTEN & DIJK, 2005). Imre *et al.* (2005) afirmam que sorovares de *S. Enteritidis* possuem apenas o gene para a proteína FliC, porém Shah *et al.* (2011) isolaram cepas de *S. Enteritidis*, recuperadas de diversas fontes de galinhas, que além de amplificarem o gene *fljB* também identificaram a expressão da flagelina de fase dois (FljB) em cepas com 100% de similaridade  
15 genética (MLVA) com a cepa *S. Enteritidis* PT4 P125109. A flagelina representa um dos imunógenos bacterianos mais ativos descritos até agora (CIACCI-WOOLWINE *et al.*, 1997; 1998; 1999; EAVES-PYLES *et al.*, 2001a; EAVES-PYLES *et al.*, 2001b; GEWIRTZ *et al.*, 2001a; BRAGA *et al.*, 2008; MIZEL & BATES, 2010; GIRARD *et al.*, 2014).

De um modo geral, antibióticos têm sido utilizados em animais para a promoção do  
20 crescimento em doses sub-terapêuticas, na prevenção e tratamento de doenças por mais de 50 anos e muitas pesquisas e experiências práticas demonstraram que o uso de antibióticos contribuiu significativamente para a melhoria do desempenho dos animais (TURNER *et al.*, 2001; CROMWELL, 2002). No entanto, tal prática resultou em complicações graves devido a resíduos dessas drogas nos produtos de origem animal e, pior, o aumento da resistência bacteriana. O reconhecimento desses  
25 perigos levou à proibição do uso subterapêutico de antibióticos em muitos países desenvolvidos e, alguns países em desenvolvimento, estão considerando seriamente uma proibição similar. Portanto, é essencial uma estratégia alternativa aos antibióticos objetivando o combate aos microrganismos, abolir a resistência a drogas e também tratar as doenças que não respondem à terapia medicamentosa como infecções virais, e para aqueles indivíduos com comprometimento do sistema imune que são incapazes  
30 de responder aos tratamentos convencionais (KOVACS-NOLAN & MINE, 2012).

Uma ampla gama de produtos alternativos e eficazes aos antibióticos tem sido alvo da comunidade científica em todo o mundo. A imunização passiva com imunoglobulinas de gema de ovo de galinha (IgY) tornou-se uma abordagem atraente, uma vez que possui uma variedade de vantagens

em relação a IgG de mamíferos, tais como conveniência, rendimento elevado, custo de produção e facilidade de manejo (SCHADE *et al.*, 2005). A administração oral de IgY de galinha específico tem se mostrado eficaz contra uma variedade de agentes patogênicos tanto em seres humanos quanto em animais, tais como *C. albicans*, rotavírus humanos, coronavírus bovino, *Vibrio* spp., *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. (SUNWOO *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2008; WITKOWSKI *et al.*, 2009; SUNWOO *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2011; NEEMA & SHIM, 2012; TOBIAS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014). Embora os efeitos benéficos de IgY de galinhas em controlar ou prevenir a doença diarreica em animais já são conhecidos há mais de duas décadas e relatados por diversos pesquisadores por todo o mundo, continua a ser uma tarefa difícil usar IgY como uma fonte alternativa ao tratamento convencional (DIRAVIYAM *et al.*, 2014). Os anticorpos da gema de ovo são importantes terapêuticamente (WIEDEMANN *et al.*, 1990; KUROKI *et al.*, 1997), mas também têm sido utilizados em ensaios de imuno-diagnóstico e para a quantificação de proteínas (GUTIERREZ & GUIRRIERO, 1990, ERHARD *et al.*, 1992; ROSOL *et al.*, 1993).

Filhotes de emas (*Rhea americana*) podem se infectar por *Salmonella* spp. entre o 8° e 12° dia de vida, quando o saco vitelino é absorvido e a ave se alimenta levando a um quadro clássico de diarreia ou mesmo chegar à vida adulta com a presença da bactéria colonizando o intestino sem apresentar sinais clínicos (TULLY Jr, 2014). O tratamento da salmonelose não complicada com antibióticos é contraindicado, pois tende a prolongar o estado de portador (D'AOUST, 1991). Novas estratégias de controle de salmonelose se tornam necessárias e a tecnologia de IgY específica pode ser uma opção ao uso de antibióticos.

Acredita-se que sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* invadem o intestino inicialmente através das células M do epitélio associado ao folículo que recobrem as placas de Peyer localizadas na porção terminal do íleo e cólon (JEPSON & CLARK, 2001; LIM *et al.*, 2009). A invasão em outras células epiteliais só ocorre após a expressão de SPI-1 que codifica um sistema de secreção tipo III (SSTT) que permitirá a entrada das bactérias nas células intestinais basolateralmente e/ou diretamente pelo polo apical (PARSONS *et al.*, 2014).

A capacidade das espécies de *Salmonella* em estabelecer infecção depende da sua capacidade de aderir, colonizar e invadir as células epiteliais do intestino. A adesão é o primeiro passo no processo de patogênese no qual as bactérias permanecem em estreito contato com as células epiteliais do hospedeiro, dando início a novos processos de patogênese, tais como colonização e invasão (D'AOUST, 1991). Bloquear o estágio primário de infecção, ou seja, a ligação bacteriana aos receptores é uma estratégia que pode ser mais eficaz para prevenir a infecção bacteriana (WIZEMANN

*et al.*, 1999). O objetivo inicial deste estudo foi avaliar a capacidade dos anticorpos de gema de ovo de emas e/ou galinhas dirigida contra a flagelina de fase dois (FljB) para prevenir a ligação dos sorovares *S. Enteritidis* PT4 (SE) e *S. Typhimurium* (ST) a células Caco-2 e dificultar a invasão em células HT-29. O segundo objetivo foi verificar se IgY específicas são capazes de inibir o crescimento *in vitro* dessas

5 bactérias.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Produção e avaliação de anticorpos antiema através da inoculação de IgY purificada em

10 coelhos e caprino

IgY de gema de ovo de uma ema hígida, não imunizada, foi utilizada como imunógeno para obtenção de anticorpos IgG anti-IgY de ema em coelhos e cabra. O procedimento de obtenção e purificação dessa imunoglobulina seguiu ao protocolo baseado nos trabalhos de Tobias *et al.* (2012) e

15 Vieira-da-Motta *et al.* (2001), em gema de ovos de avestruzes e galinhas, respectivamente.

### 5.2.2 Extração de IgY das gemas de ovos

A gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com PBS, pH 7,2. O seu conteúdo

20 foi removido por punção com pipeta de Pasteur e transferido para recipientes estéreis. A seguir, as gemas foram diluídas com água destilada na proporção de 1:10 (v:v) e em seguida acidificadas (pH 5,0) deixadas em repouso por 16 horas a 4° C. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000xg por 30 min a 4° C. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio (Merck, Alemanha) sob agitação, em quantidade suficiente para atingir 29% de saturação (p/v). A solução foi mantida à

25 temperatura ambiente, sob agitação, por 2 horas e centrifugadas a 10.000xg por 30 min. As soluções purificadas da gema contendo IgY foram dialisadas em PBS, e em seguida submetidas à filtração esterilizante (0,22mm). Posteriormente as amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20°C.

### 5.2.3 Purificação de anticorpos IgY em coluna de afinidade HiTrap™ IgY (GE®)

Nesta etapa a amostra obtida anteriormente foi submetida à purificação utilizando um kit de purificação com coluna de afinidade HiTrap™IgY (GE®) com capacidade para 5 mL e capacidade de ligação de até 100 mg de IgY pura. O protocolo de extração seguiu a recomendação do fabricante. Resumidamente, a coluna foi estabilizada com 25 mL de solução tampão fosfato de sódio 20 mM com 5 0,5 M de sulfato de potássio, pH 7,5 (tampão de ligação) seguido de solução tampão de fosfato de sódio 20mM pH 7,5 (tampão de eluição), e, finalmente, com tampão fosfato de sódio 20mM, com solução de isopropanol 30%, pH 7,5 (tampão de lavagem). Depois de estabilizada, a amostra foi aplicada na coluna utilizando uma bomba peristáltica. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 50 mL de tampão de ligação, e, finalmente, a amostra foi eluída com 50 mL da solução 10 tampão de eluição. As amostras foram coletadas durante a eluição em alíquotas de 1,0 mL, e, posteriormente, acondicionadas a -20°C até a quantificação dos anticorpos IgY.

#### 5.2.4 Quantificação de IgY

15 A dosagem das imunoglobulinas extraídas a partir das gemas de ovos foi realizada através do método do ácido bicinconínico (BCA; Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) relatada por Smith *et al.* (1985). As frações também foram checadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 5-12% na presença de SDS.

#### 20 5.2.5 Imunização de caprino e coelhos com IgY purificada

O material utilizado para as imunizações em coelhos e caprino correspondeu às alíquotas mais puras obtidas pelo processo de extração por cromatografia de afinidade. Foram utilizados três coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, pesando aproximadamente 25 3,0 Kg e adquiridos do setor de Cunicultura da Universidade Federal de Viçosa. Esses animais foram mantidos durante todo o experimento no biotério da Unidade de Experimentação Animal da UENF em condições ambientais e nutricionais satisfatórias. Também foi utilizado um caprino hírido macho, adulto, mestiço, com aproximadamente 30 Kg, adquirido de uma propriedade particular do município de Campos dos Goytacazes, RJ. Durante o experimento o animal ficou alojado no setor de Clínica de 30 Grandes Animais do Hospital Veterinário da UENF, em condições ambientais e nutricionais satisfatórias para a espécie.

Esse procedimento seguiu protocolo realizado por Tobias (2011) pelo qual inicialmente uma suspensão contendo 0,5 mg/mL de IgY purificada foi emulsionada 50% (v/v) com adjuvante completo de Freund (ACF) e inoculada 0,5 mL por via subcutânea na região da coxa em cada animal. Vinte e um dias depois foi realizado um primeiro reforço, utilizando a mesma dose, via e local de aplicação, porém com adjuvante incompleto de Freund (AFI). Após um intervalo de 14 dias, foi inoculada a terceira dose por via intradérmica na região dorsal com 2 mg/mL IgY (1 mL por animal sendo 0,25 mL por ponto) ressuspensa em solução salina (NaCl a 0,15M). Após a terceira aplicação ainda foram inoculadas mais três doses com intervalo de sete dias via intradérmica, na região dorsal na dose de 2 mg/mL (1 mL por animal sendo 0,25 mL por ponto). De cada animal foi coletada amostra de sangue antes de cada inoculação e quinze dias após a última inoculação, o sangue foi colhido via jugular no caprino e nos coelhos na veia coxo-femural e, os soros armazenados a -20°C até o seu processamento. O soro obtido no dia zero, antes das imunizações foi utilizado como controle negativo.

A dosagem de imunoglobulinas obtidas a partir do soro dos coelhos e caprino (IgG anti-IgY de ema) foi realizada através do método BCA (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA). As frações também foram checadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 5-12% na presença de SDS.

### 5.2.6 Titulação de IgG anti-IgY de ema por ELISA

A titulação de anticorpos do soro dos animais foi monitorada através de prova imunoenzimática (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) de acordo com o protocolo do estudo de Vieira-da-Motta *et al.* (2001). Foram preparadas diluições seriadas dos soros contra o antígeno (IgY de ema - 2µg/mL) diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Após incubação a 37° C por 2 h das placas de 96 poços (NUNC MaxiSorp™, EUA), sensibilizadas com o antígeno, seguido de três lavagens com solução de tampão PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST). Em seguida, foi feito bloqueio com gelatina 1% (Sigma Aldrich, EUA), diluída em PBST (PBSTG) seguido de incubação em temperatura ambiente por 60 minutos em temperatura ambiente. Após a etapa de bloqueio, três lavagens consecutivas com solução PBST. Em seguida, os poços foram preenchidos com 100 µl dos respectivos soros e diluídas em solução PBSTG (1:1000 a 1:128000) e incubadas a 37°C/45 minutos, seguido de três lavagens com solução PBST. O passo seguinte foi a adição de 50 µl do anticorpo anticoelho ou anticabra (Sigma, EUA) conjugados a peroxidase diluídos 1:1.000 em PBS e incubação a 37°C por 45 minutos. Em seguida, a placa foi lavada com PBST e a reação revelada pela adição de 50 µl de

solução ácida com substrato enzimático contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ortofenildiamina – OPD (Sigma-Aldrich, EUA). A reação foi interrompida após 2 minutos de incubação à temperatura ambiente ao abrigo da luz, com a adição de 50 µl de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3N, com leitura realizada em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific) a 492 nm.

5

### 5.2.7 Purificação de anticorpos totais do soro hiperimune de coelho e caprino

O protocolo para purificação de IgG anti IgY de ema do soro de coelhos e caprino, utilizando ácido caprílico, foi adaptado Russ *et al.* (1983). Os soros (10 mL) foram diluídos 1:3 (v/v) em tampão acetato de sódio pH 4,0 e o pH da solução ajustada para 4,5. A seguir adicionou ácido caprílico (coelho 0,75 mL/10 mL e caprino 0,7 mL/10 mL de soro) lentamente sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente, e em seguida centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e o pH ajustado para 7,0. Em seguida o sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 g/20 minutos a 4°C. O sobrenadante dessa fase foi precipitado lentamente, sob agitação, com sulfato de amônio até 15 45% (p/v), deixando 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 5.000 g por 15 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido com 1,0 mL de PBS e transferido para membrana de diálise onde foi submetido à diálise durante dois dias em solução salina 0,85%, com intervalo de 12 horas, a 4°C. Após esse procedimento, alíquotas de amostras foram armazenadas a -20°C.

20

### 5.2.8 Purificação de IgG anti-IgY de ema de soro hiperimune utilizando coluna de afinidade HiTrap™

Após a purificação das imunoglobulinas do soro utilizando ácido caprílico, a solução contendo 25 IgG foi submetida à purificação com coluna de afinidade com capacidade para um mL e capacidade de ligação de até 25 mg de IgG. Inicialmente a coluna foi preparada e lavada com quatro mL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 (tampão de início). Depois de equilibrar a coluna com mais três mL de tampão de início, as amostras de coelho e caprino foram aplicadas em colunas diferentes. Depois foram adicionados três mL do tampão de eluição (Glicina- HCl 0,1 M , pH 2,7). As amostras foram 30 alíquotadas e armazenadas a -20°C.

### 5.2.9 Biotinilação de anticorpos IgG de coelho e caprino anti-IgY de ema

Para a biotinilação da IgG purificada de cada espécie animal, utilizou-se uma coluna de gel filtração com capacidade de ligação de até 10 mg/mL (Kit Immunoprobe Biotinylation – Sigma).  
5 Inicialmente a coluna foi equilibrada com 30 mL de PBS 0,01M. Em seguida, aplicou-se na coluna uma solução contendo um mL de IgG a 10 mg/mL em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 diluída em 38 µL de reagente de biotinilação (BAC-SulfoNHS). Essa solução antes de ser aplicada passou por uma incubação de 30 minutos a temperatura ambiente. Foi eluído com nove mL de PBS 0,01M e cada alíquota com 1,0 mL foi armazenada a -20°C e posteriormente analisada.

10

### 5.2.10 Avaliação da especificidade da IgG marcada com biotina anti-IgY de ema frente a anticorpos de diferentes espécies animais

A especificidade do anti-anticorpo produzido em coelho e caprino marcado com biotina foi  
15 testada por ELISA contra soros de outras espécies de aves e também mamíferos. Foram testados, além do soro de ema, soros de um avestruz (*Struthio camelus*), um emu (*Dromaius novaehollandiae*), uma galinha (*Gallus domesticus*), um bovino (*Bos taurus*), um canino (*Canis familiaris*) e um felino (*Felis silvestris catus*). A sensibilização da placa para o teste de ELISA foi feita com soro das diferentes espécies na diluição de 1:1.000 em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 e a placa incubada a  
20 37°C por duas horas. Em seguida a placa foi lavada com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST). Foi feito um bloqueio com gelatina 1% (Sigma) diluída em PBS (PBSG), deixando uma hora em temperatura ambiente e então lavada quatro vezes com PBST. Em seguida foi adicionado 50 µL em cada poço do anticorpo antiema biotilado diluído 1:500 até 1:64.0000 em PBSTG e então incubada a  
25 37°C por 45 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, a placa foi lavada com PBST por três vezes. Em seguida, adicionou-se em cada poço 50 µL de avidina marcada com peroxidase na diluição de 1:1.000 e a placa foi incubada por uma hora a 37°C. Após quatro lavagens com PBST a reação foi revelada pela adição de 50 µL de substrato enzimático contendo 3,25 mL de ácido cítrico 0,1 M, 3,5 mL de fosfato de sódio 0,2 M, 5,75 mL de água destilada, 5,0 µL de água oxigenada 30V e 5 mg de orto-fenildiamina (OPD). Em seguida a placa foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz e a reação  
30 interrompida com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N, seguido da leitura, em espectrofotômetro, a 492 nm.

## 5.2 11 Produção de IgY anti proteínas de *S. enterica* em emas e galinhas

5. 2. 11. 1 Produção de proteínas recombinantes obtida pela clonagem dos genes *inva*, *SefA* e *FljB* de *S. Enteritidis* PT4

5

5. 2. 11. 1. 1 Seleção do gene de *S. Enteritidis*

Para a seleção dos genes foi realizada uma busca tanto na literatura (banco de dados PubMed, disponível no website

10 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=geneecmd=Retrieveedopt=full\\_reportelist\\_uids=6949452](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=geneecmd=Retrieveedopt=full_reportelist_uids=6949452)), quanto no genoma anotado de *Salmonella enterica* subespécie *Enterica* serovar *Enteritidis* numero de acesso NC\_011294.1 (disponível no banco de dados National Center for Biotechnology Information – NCBI, disponível no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)

15 A busca na literatura envolveu a pesquisa de estudos que abordassem a identificação e caracterização de genes fimbriais *fimA* e *sefA* e do gene flagelar *fljB* adequados para clonagem e produção de proteína recombinante.

Uma vez selecionados os genes, os pares de oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir da sequência nucleotídica desses genes, obtida no genoma anotado, inicialmente<sup>1</sup>, de *S. Enteritidis* PT4 P125109 com números de acesso YP\_002243179.1, YP\_002242672.1 e 20 YP\_002246267.1 para os genes *fljB*, *fimA* e *sefA* respectivamente. Para tal utilizou-se o programa BioEdit version 7.0.9.0 (6/27/07) (HALL, 1999).

5. 2. 11. 1. 2 Cepa de *S. Enteritidis*

25 Foi utilizado o material genético da bactéria *S. Enteritidis* cepa NCTC 13349, cedida gentilmente pela Professora Dra Susana Campoy do Departamento de Genética e Microbiologia da Universidade Autônoma de Barcelona, Espanha.

---

<sup>1</sup> A notação das sequências YP\_002243179.1, YP\_002242672.1 e YP\_002246267.1 foram substituídas por WP\_000079833.1, WP\_012543330.1 e WP\_012543423.1 para as proteínas codificadas pelos genes *fljB*, *fimA* e *sefA*, respectivamente, por serem 100% idênticas. Esses registros agora são identificados como “*non-redundant protein sequence*”. As sequencias das proteínas fimbriais (WP\_012543330.1 e WP\_012543423.1) foram removidas do banco de dados pela equipe do NCBI RefSeq. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/prokaryotes/reannotation/>

### 5. 2. 11. 1. 3 Extração do DNA genômico de *S. Enteritidis*

A bactéria *S. Enteritidis* foi cultivada em caldo LB (Luria Bertani) *over night* a 37°C. Após o crescimento bacteriano as células foram centrifugadas para formação do sedimento. Utilizou-se o kit DNeasy® Blood&Tissue (QIAGEN) e o protocolo de extração seguiu a recomendação do fabricante. Após a obtenção do DNA foram estimadas a sua quantidade e qualidade por NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### 5. 2. 11. 1. 4 Clonagem dos gene *fimA*, *fljB* e *sefA*

Foram desenhados *primers* específicos para amplificar o DNA completo do gene *fljB* (*fljB*For:

5' - CGGAATTCGCACAAGTCATTAATACAAAC - 3' e *fljB*Rev: 5' - CCGCTCGAGTTAACGCAGTAAAGAG - 3'); do gene *fimA* (*fimA*For: 5' - CGGAATTCACCTCTACTATTGCGAG - 3' e *fimA*Rev: 5' - CCGCTCGAGTTATTCGTATTTTCATGATAAAG - 3') e do gene *sefA* (*sefA*For: 5' - CGGAATTCGGAATGCTAATAGTTGATTT - 5' e *sefA*Rev: 5' - CCGCTCGAGTTAGTTTTGATACTGCT - 3') tendo como referência as sequências depositadas no banco de dados GenBank (cód. acesso YP\_002243179.1, YP\_002242672.1 e YP\_002246267.1, respectivamente).

A amplificação do DNA foi feita em solução com volume final de 50µL para cada amostra, contendo 10µL de DNA molde, 25 µL de mistura para PCR da Thermo Scientific PCR Master mix, 1 µL de cada *primer* e 13 µL de água ultrapura que compõe o Kit Thermo Scientific PCR Master Mix. Para a amplificação dos genes, a solução foi submetida, em um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler® (Applied Biosystem, EUA), durante 35 ciclos de amplificação, compreendidos por desnaturação a 95°C durante 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C durante 45 segundos. Após esses ciclos procedeu-se etapa final de 72°C por sete minutos. Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (0,5X), a 100V, durante aproximadamente 40 minutos, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta em Sistema de Visualização e Processamento de Imagens MiniBispPro® (Bio América Inc., EUA) utilizado um transiluminador UV (DyNA Light, Labnet, EUA) com digitalizador acoplado (Gel Logic 112, CARESTREAM, EUA) para documentação por imagem, usando marcador de peso molecular de 100pb (Promega, Madison, WI, EUA) (Ladder 100PB, Ludwig Biotec, Brasil).

Fragmentos amplificados com 1518 pb que codificam para *fljB*, 543 pb (*fimA*) e 537 pb (*sefA*) foram ligados ao vetor de clonagem pGEX-4T-1 (GE Healthcare), que contém o promotor forte indutível tac e a sequência codificadora da enzima glutationa transferase (GST, 25 kDa) produzindo a construção plasmidial: pGEX-*fljB*, pGEX-*fimA* e pGEX-*sefA*, respectivamente. Para o fragmento foi  
5 desenhado *primer forward* contendo um sítio de restrição para a endoclunase EcoRI e os *primers reverse* para XhoI. Os plasmídeos recombinantes foram propagados em *E. coli* DH5 $\alpha$  através de eletroporação e em seguida selecionados em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) com ágar e o agente selecionador Ampicilina (50  $\mu$ g/mL) e Cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL). Todas as construções obtidas foram confirmadas por PCR e restrição enzimática. Os clones positivos da construção foram sequenciados  
10 em ambas as direções pela empresa Macrogen Europe (Amsterdam, Holanda).

#### 5. 2. 11. 1. 5 *Ensaio de expressão e purificação das proteínas recombinantes recFimA, recFljB e recSefA*

15 A construção plasmidial em vetor de expressão, pGEX – 4T-1, foi utilizada para transformar cepas de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Promega, USA) por choque térmico e, em seguida, selecionados em meio ágar LB (MARANHÃO, 2003). A construção obtida foi confirmada por PCR. A indução de expressão foi realizada com a adição IPTG (isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo), um análogo sintético e não degradável da lactose ao qual se associa ao repressor inibindo-o e assim deixando o promotor livre  
20 para a transcrição do gene. Após a indução da expressão, as células bacterianas foram lisadas usando um disruptor de células ultrassônico (Unique, mod. DES500) ajustado para a amplitude de 20% por 4 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. As amostras foram resfriadas em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e em seguida realizou-se a purificação da proteína recombinante associada à proteína de fusão GST utilizando a  
25 resina de Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences) seguindo as recomendações do fabricante. A proteína de fusão foi clivada pela enzima trombina (1U/ $\mu$ L) por 16 horas a 22-25°C. A quantidade de proteína de cada fração foi determinada pelo método BCA seguindo as especificações do fabricante (BCA; Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) sendo utilizado soro albumina bovina (BSA, Sigma, EUA) como proteína de referência. Além disso, todas as frações também foram  
30 checadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 5-12% na presença de SDS.

#### 5. 2. 11. 1. 6 *Imunização das aves com proteína recombinante recFljB*

Os procedimentos de manejo, imunização e coleta de amostras (sanguíneas e ovos) das aves experimentais foram realizados no Criatório Científico de emas (Emário) e no Biotério de aves da UENF, no município de Campos dos Goytacazes/RJ.

Foram utilizadas como parcelas experimentais na produção de anticorpos policlonais, três emas (*Rhea americana*) adultas em fase de reprodução e três galinhas (*Gallus gallus*) da raça *Lohman White* com 44 semanas de idade e com 100% de postura. Todas as aves receberam a flagelina recombinante FljB de *Salmonella* Enteritidis como antígeno (200 µg por imunização). Cinco imunizações, intervaladas de 15 dias, foram realizadas por injeções, em dois pontos diferentes, no *Musculus pectoralis* das galinhas e no músculo gastrocnêmico cabeça lateral das emas contendo a solução de antígeno emulsificada em 50% (v/v) de adjuvante completo de Freund (1ª imunização) e adjuvante incompleto de Freund (imunizações seguintes) diluídos em solução tampão PBS estéril (pH 7,2), perfazendo um volume total de 1,0 mL. As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia braquial, antes e após cada imunização, sendo a última coleta realizada 15 dias após a última inoculação. Já a coleta dos ovos produzidos por todas as aves foi realizada diariamente. Uma semana antes da primeira imunização foram coletados ovos (pré-ímmunes).

#### 5. 2. 11. 1. 7 *Extração e purificação de IgY das gemas de ovos*

20

O protocolo para extração e purificação de IgY de gemas de ovos de emas e galinhas foi baseado nos trabalhos de Tobias *et al.* (2012) e Vieira-da-Motta *et al.* (2001), em gema de ovos de avestruzes e galinhas, respectivamente.

Cada fração de IgY obtida foi quantificada pelo método BCA (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e checadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 5-12% na presença de SDS.

25

#### 5. 2. 11. 1. 8 Titulação de IgY pré e pós-imune por ELISA

A titulação das IgY purificados das gemas de ovos das galinhas e emas, e também dos anticorpos do soro das aves foi monitorada por ELISA em diluições seriadas contra o antígeno diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Para tal, foi utilizado o protocolo do ensaio pertinente ao estudo de Vieira-da-Motta *et al.* (2001) como descrito no item 5.2.6.

#### 5. 2. 11. 1. 9 Western blot

A proteína recombinante FijB foi analisada por meio da técnica de “Western blot” utilizando anticorpos específicos. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de policrilamida a 12% (SDS-PAGE), de acordo com Laemli (1970), e então transferidas para membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Biorad), segundo metodologia de Towbin (1979). A membrana de nitrocelulose e outros componentes do sistema de eletrotransferência foram imersos em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol, 3,7% SDS). Em seguida, o sanduíche contendo o gel foi montado segundo orientações do fabricante Bio-Rad – Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Esse sistema foi submetido à corrente de 10V por duas horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBST- L (PBS, pH 7,2, com 0,1% de Tween 20 e 3% de leite em pó desnatado) *overnigth* sob agitação de 4 a 8°C. Após o bloqueio, cada membrana foi incubada com o anticorpo primário (IgY de ema ou IgY de galinhas imunizadas) na diluição de 1:2000 em PBST-L durante duas horas sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas por três vezes, cada uma durante 5 minutos com PBST 20 (PBS, pH 7,2 com 0,1% de Tween 20), e incubada, com o anticorpo secundário (*Rabbit Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule)-Peroxidase antibody* – Sigma® ou IgG anti- IgY de ema biotinizada) na diluição de 1:2000 durante duas horas sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi novamente lavada por três vezes, cada uma durante cinco minutos. Em seguida a membrana foi incubada com Avidina marcada com peroxidase na diluição de 1:500 em PBST - L por 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. Após mais três lavagens da membrana, cada uma de cinco minutos a reação foi revelada com uma solução contendo Tris HCl 1 M ph 7,4; 100 mM de imidazol , peróxido de hidrogênio, água destilada e substância cromógena 3,3’ diaminobenzidina (DAB-Sigma-Aldrich, EUA). Assim que as bandas tornaram-se claramente visíveis, a reação foi interrompida pela adição de água.

## 5.2.12 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti-recFljB sobre o crescimento, adesão e invasão de cepas de *Salmonella in vitro*

### 5.2.12.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

5

Para a avaliação da atividade de anticorpos IgY anti-recFljB, produzida em ema e galinhas, foram utilizadas, além da cepa de *S. Enteritidis* NCTC 13349, cepa de *S. Typhimurium* cepa ATCC 14028, cedidas gentilmente pela Prof<sup>a</sup> Dra Susana Campoy do Departamento de Genética e Microbiologia da Universidade Autônoma de Barcelona, Espanha e, pela Prof<sup>a</sup> Dra Dália dos Prazeres Rodrigues Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas/IOC/Fiocruz – Rio de Janeiro.

Para os experimentos da atividade de IgY anti-recFljB no crescimento bacteriano, na adesão e invasão *in vitro* de SE e ST em monocamadas de enterócitos humanos (caco-2 e HT-29) foi utilizada alta concentração de NaCl (0,3M) em meio líquido (caldo BHI) em tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 ml e incubados *overnight* a 37°C com agitação de 200 rpm, tendo como objetivo a indução do SPI - 1 e, conseqüentemente, dos flagelos de acordo com os resultados obtidos por Ibarra *et al.* (2004), Shah *et al.* 2011 e Eom *et al.*, (2012).

A partir desses cultivos foram preparados inóculos em solução salina contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (DO = 0,5; Densimat, bioMerieux, França).

20

### 5.2.12.2 Cultivo celular

As linhagens celulares Caco-2 (ATCC HTB-37) e HT-29 (ATCC HTB-38) foram utilizadas para os ensaios de adesão e invasão, respectivamente. Ambas as linhagens celulares foram rotineiramente mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM Invitrogen; Life Technologies Europe, Zug, Switzerland) suplementadas com soro fetal bovino (15% (v/v) para as células Caco-2 e 10% (v/v) para as células HT-29) e gentamicina numa concentração final de 50 µg mL<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Foram mantidas em atmosfera de 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C (HEPA CLASS 100, Thermo Scientific) e usadas entre 10-20 passagens. Para os ensaios de adesão e invasão as células foram semeadas em placas de 24 poços (2cm<sup>2</sup>/poço) a uma concentração de  $2,8 \times 10^4$  células/poço (Caco-2) e  $4.0 \times 10^4$  células/poço (HT-29). O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias e

30

meio sem antibiótico (o que foi usado?) foi usado na última troca antes dos testes. Os experimentos foram realizados 15 (Caco-2) e 21 (HT-29) dias após a semeadura para atingirem a maturidade (LESUFFLEUR *et al.*, 1993; PINTO *et al.*, 1983).

### 5 5.2.12.3 Teste de inibição do crescimento

Aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de ambas as cepas de *Salmonella* foram incubadas a 37°C em caldo BHI acrescido de 0,3M de NaCl na presença de IgY pré ou pós inoculações anti recFijB (pré ou pós imune) nas concentrações de 1, 3, 5 e 10 mg/mL. Os cultivos foram lidos utilizando um  
10 fotômetro (Densimat, bioMerieux, França) a cada hora para avaliar o efeito de IgY sobre o crescimento bacteriano nos diferentes tratamentos. Foi realizada diluição seriada dos cultivos após atingirem o nível de saturação (DO=7,5) e, 100 µL das diluições foram distribuídos em placas com ágar nutriente, em triplicata, para contagem das UFC. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Culturas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) não tratadas com IgY e cultivadas nas mesmas  
15 condições foram utilizadas como controle.

### 5.2.12.4 Teste de adesão

Os ensaios de adesão das cepas de *Salmonella* foram realizados com a linhagem Caco-2  
20 como previamente descrito por Gagnon *et al.* (2013), com algumas modificações. Após o crescimento, como descrito acima, os cultivos bacterianos foram centrifugados por 5 minutos a 5000 g, lavados duas vezes com PBS (pH 7,4) estéril e ressuspendido a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> em meio DMEM. Um inóculo com concentração final de  $2 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> foi adicionado em uma solução com 10 mg mL<sup>-1</sup> de IgY pré-imune ou pós-imune (volume final de 1,0 mL) foi incubado por 1 hora a 37°C. Após esse período a  
25 solução contendo IgY e *Salmonella* foi adicionada diretamente sobre a monocamada de células Caco-2 lavadas 1 vez com PBS (pH 7,4) estéril, em triplicata, e deixado aderir por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as bactérias não aderidas foram removidas com quatro lavagens seguidas com PBS (pH 7,4) estéril. As células com bactérias aderidas foram tratadas com 250 µL de Tripsina-EDTA (Invitrogen; Life Technologies Europe) por poço e incubadas a 37°C por 10 minutos e então adicionado  
30 250 µL de meio DMEM com soro fetal bovino para parar a reação com a tripsina. Com objetivo de contar as UFC, diluições seriadas foram preparadas em PBS estéril (pH 7,4) e 100 µL foi plaqueado

em ágar nutriente (Difco, EUA), incubado 37°C por até 48h. Em triplicata, células não tratadas com IgY, infectadas com as mesmas concentrações das duas cepas de *Salmonella* e cultivadas nas mesmas condições foram utilizadas como controle.

#### 5 5.2.12.2 5 Teste de invasão

A habilidade da *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* invadir células intestinais HT-29 na presença de IgY foi avaliada seguindo o método descrito por Gagnon *et al.* (2013), com algumas modificações. Resumidamente, as suspensões bacterianas na presença de IgY como descrito para o teste de adesão  
10 foram diretamente aplicadas sobre as camada de células epiteliais intestinais (HT-29) e incubadas a 37°C por três horas. As células infectadas foram lavadas duas vezes com PBS estéril (pH 7,4) antes da adição da 250 µl DMEM contendo 150 µg mL<sup>-1</sup> de gentamicina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) por poço e incubadas a 37°C por uma hora para matar as bactérias extracelulares que não tinham invadido as células. Depois de lavar mais duas vezes com PBS, 250 µL de Tripsina-EDTA  
15 (Invitrogen; Life Technologies Europe) por poço e deixado sob incubação a 37°C por 10 minutos. As células infectadas foram rompidas usando 250 µL 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma) por poço. Depois de 10 min de incubação a 37°C, 100 µL de cada poço foi coletado para determinar a contagem de *Salmonella* como descrito acima no teste de adesão. A eficiência da invasão foi expressa como a porcentagem do número de bactérias que invadiram pelo número total de *Salmonella* associada à  
20 célula. O número de *Salmonella* associada às células foi determinado utilizando o mesmo protocolo de invasão, porém sem adicionar a gentamicina, tal como descrito acima.

#### 5.2.13 Análise estatística

25 Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software *Graph Pad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Para a produção média de proteínas totais os dados foram analisados pelo teste T-Student considerando nível de significância de 5% (p<0,05). Para o teste de inibição do crescimento, que foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes, foi aplicado teste T-Student considerando nível de significância de 5% (p<0,05) para comparar  
30 tratamentos pré e pós-imune nas contagens de UFC em meios sólidos e análise de variância (Two way-ANOVA) seguido do Teste de Bonferroni para comparar a taxa de crescimento a cada hora,

realizado de maneira independente para cada uma das condições experimentais, o intervalo de confiança foi de 95%, adotando o valor  $p < 0,05$  como nível de significância. Tanto o teste de adesão como o de invasão também foram conduzidos em triplicata e em três experimentos independentes. A análise de variância (One way-ANOVA) foi usada para avaliar o efeito da IgY na adesão e invasão das cepas de *Salmonella* em células Caco-2 e HT-29, respectivamente. As médias foram comparadas por teste Tukey considerando nível de significância de 5%, ou seja, os dados foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ .

#### 5.2.14. Comitê de Ética

Esse estudo foi regulamentado segundo Autorização IBAMA SISBIO – atividade científica: n° 18981-2 e Autorização de Manejo da Fauna Silvestre, também para atividades científicas, N° 0000000011/2011-RJ. E possui autorização da Comissão de Ética de Uso de Animais – CEUA, da Universidade Estadual do Norte Fluminense (protocolo n° 219).

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Imunizações e bem-estar animal

Os efeitos das preparações imunes utilizadas neste estudo foram acompanhados em todos os grupos de animais estudados. Entre os mamíferos, os coelhos apresentaram granulomas visíveis nos locais de vacinação. Essa reação só foi observada na primeira imunização com o uso do adjuvante completo de Freund e, aproximadamente, dez dias depois as lesões desapareciam quase por completo e nenhuma alteração de comportamento ou na alimentação foi observada durante todo o experimento. O caprino não desenvolveu nenhuma lesão nos locais das inoculações.

Quanto às aves, nas três emas selecionadas para o experimento, observou-se um grande aumento de volume no local de aplicação dos antígenos que em uma delas permaneceu durante toda a pesquisa. A postura das emas também foi afetada pelas imunizações. Apenas uma das emas manteve a postura por quatro semanas após a primeira imunização, ou seja, dois dias antes da 3ª imunização essa ema interrompeu a postura, obtendo assim um total de oito ovos. As outras duas emas interromperam a postura imediatamente após a 1ª imunização, uma com apenas um ovo, dois dias depois da inoculação do antígeno, e a terceira parou a postura por completo e veio a óbito duas

semanas depois de iniciado o experimento por motivos desconhecidos. Já as galinhas toleraram bem as imunizações sem nenhuma lesão, ou alteração de comportamento ou na postura.

### 5.3.2 Produção e avaliação de anticorpos anti-ema através da inoculação de IgY purificada em coelhos e caprino

5

O método de extração e purificação de IgY da gema de ovo de ema foi eficiente e apresentou um rendimento final de 15,8 mg/mL. A figura 3 evidencia o perfil eletroforético do purificado da gema de ovo de uma ema hígida que foi utilizado na imunização de coelhos e caprino. Observam-se duas bandas, uma com aproximadamente 65-70 kDa e outra com 30 kDa, correspondendo às cadeias pesadas e leve da IgY do ovo de ema, respectivamente.

10

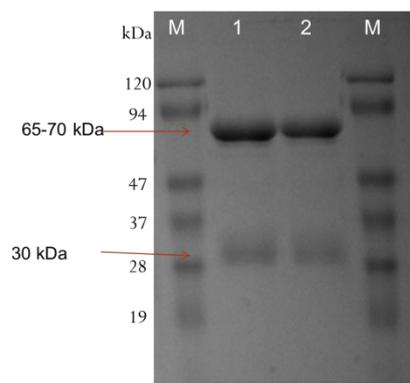


FIGURA 3. Perfil eletroforético da IgY de ema purificada em coluna HiTrap™ IgY™ – GE. (Gel de SDS-PAGE 12%). M: marcador de peso molecular; 1-2 eluido de solução de IgY obtido de gema de ovo de ema (*Rhea americana*)

15

Tanto coelhos quanto caprino apresentaram boa resposta à imunização com IgY de ema. A figura 4 apresenta a titulação dos soros do caprino (figura 4A) e do coelho com melhor resposta (figura 4B). A resposta imunológica foi diferente em cada coelho (dado não apresentado). É possível observar que a IgY de ema apresentou densidade ótica (DO) superior para o caprino, comparado com os resultados dos coelhos. Apesar dessa observação, é importante ressaltar que a diminuição da DO é gradativa para os anticorpos produzidos em caprino.

20

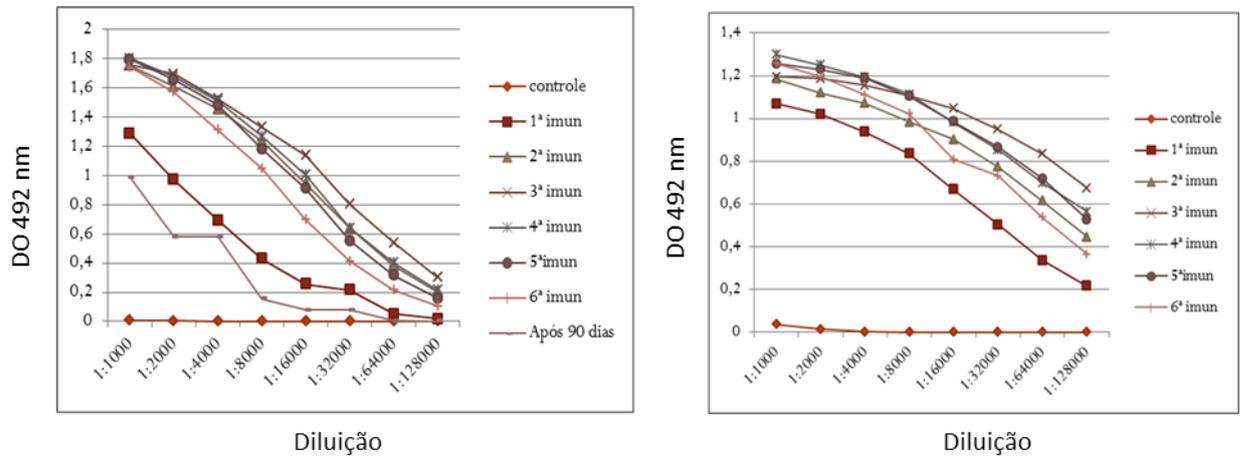


FIGURA 4. Titulação por ELISA de anticorpos IgG de Caprino (A) e coelho (B) anti-IgY. As linhas coloridas mostram a titulação de soro dos animais imunizados com IgY colhidos no dia zero (controle) e após a 1ª- 6ª inoculações. E 90 dias após a 6ª inculação para o caprino (dia 146).

O perfil eletroforético das frações antes e após a etapa de diálise e após a purificação em coluna de afinidade pode ser observado na figura 5. A purificação em cromatografia de afinidade favoreceu a obtenção de IgG antiema mais limpa, com eliminação de bandas consideradas contaminantes ou indesejáveis.

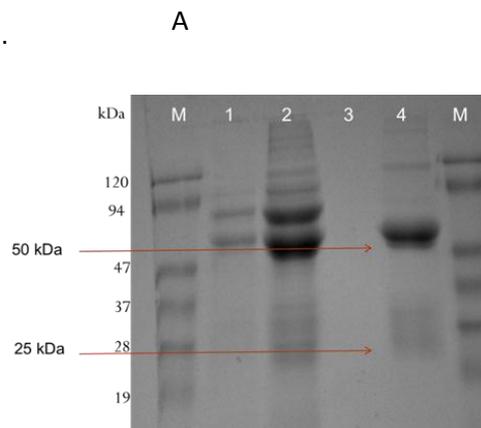


FIGURA 5. Perfil eletroforético da IgG de coelho: M – Protein MW Marker; 1- Antes da diálise; 2 – Após a diálise 3 – vazio; 4 – Após Purificação em coluna HiTrap™ – GE., SDS-PAGE a 12%

Após a marcação com biotina, os anticorpos IgG antiema produzidos em caprino e coelhos foram testados, por ELISA direto, quanto a sua especificidade contra o soro de outras espécies animais. Conforme esperado, as titulações frente as três espécies de ratitas (ema, avestruz e emu), produzido tanto em coelhos como em caprino, confirmaram a especificidade da IgG antiema. Os anticorpos produzidos em coelhos apresentaram maiores títulos que os produzidos em caprino (Figura

6A e 6B). Por outro lado, conforme esperado, as amostras de soros das demais espécies (cão, gato e bovino) mostraram titulações visivelmente inferiores.

Embora os anticorpos de coelho tenham apresentado uma DO acima daquela apresentada pelos anticorpos (AC) do caprino, foi possível observar que frente à outra espécie de ave (galinha) estes AC de caprino foram mais específicos, baseados nas titulações. Enquanto a titulação de IgG de coelho de 1:8000, tanto nas ratitas como nas galinhas ainda foi possível detectar fraco reconhecimento; o mesmo não aconteceu com IgG de cabra frente aos AC de ema, quando comparado com galinha.

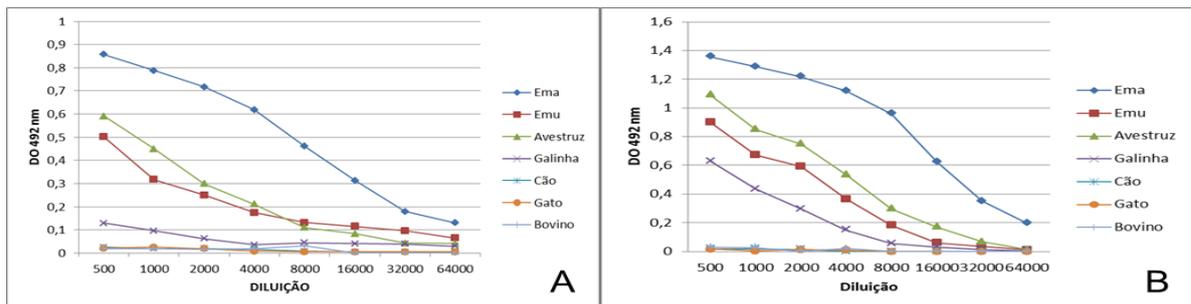


FIGURA 6. Titulação por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo antiema produzido em caprino (A) e coelho (B) frente ao soro de diferentes espécies animais.

### 5.3.3. Produção de IgY antiproteínas de *salmonella enterica* em emas e galinhas

#### 5.3.3.1 Os antígenos

Os genes fimbriais (*fimA* e *sefA*) e flagelar (*fljB*) da *Salmonella enterica* serovar Enteritidis cepa NCTC 13349 foram selecionados e então amplificados para clonagem e expressão das respectivas proteínas, de alta imunogenicidade, codificadas por eles. A figura 7 ilustra, respectivamente, o resultado da amplificação dos genes que geraram produtos com 1518 pb (*fljB*), 543 pb (*fimA*) e 537 pb (*sefA*). Os produtos obtidos por PCR corresponderam com os tamanhos previstos/esperados e não apresentaram bandas inespecíficas.

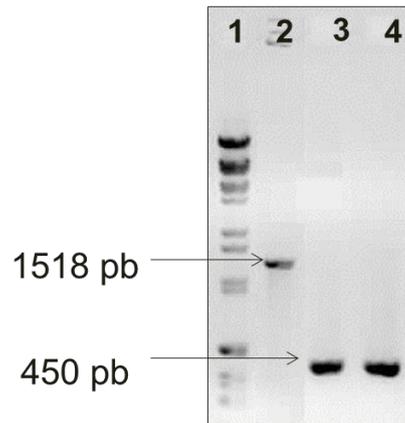


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR. 1) Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific™); 2) gene *fljB*; 3) gene *fimA* e 4) gene *sefA*.

- 5 As construções plasmidiais pGEX-*fljB*, pGEX-*fimA* e pGEX-*sefA* foram propagadas com sucesso em *E. coli* DH5 $\alpha$  para clonagem e em cepas de *E. coli* BL21(DE3) para a expressão das proteínas FljB, FimA e SefA, respectivamente. A figura 8 ilustra o perfil eletroforético das três proteínas induzidas com IPTG e não induzidas. Pode-se observar, comparando a amostra de células induzidas e não induzidas, a obtenção de altos níveis de expressão após a adição do indutor (IPTG).

10

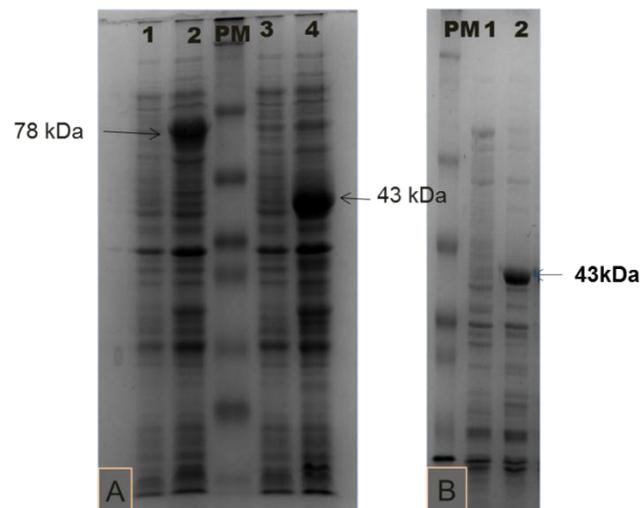


FIGURA 8: Expressão dos clones BL21-FljB, BL21-FimA e BL21-SefA. Perfil eletroforético, SDS-PAGE a 12%, das amostras que apresentaram expressão quando induzidas com IPTG (6A: 2 e 4; 6B: 2) e o controle, com as amostras que não sofreram indução ((6A: 1 e 3; 6B: 1). As proteínas recombinantes fusionadas a proteína de fusão (GST) correspondentes aos induzidos FljB (78kDa), FimA (43kDa) e SefA (43kDa) estão indicadas por setas. PM – marcador de peso molecular.

15

Após a lise das bactérias foi possível obter proteínas solúveis no sobrenadante e purificá-las através da coluna de afinidade contendo glutathione reduzida e clivagem por Trombina somente para o clone BL21- FliJ. As recombinantes FimA e SefA não foram observadas na fração solúvel. A figura 9 demonstra o perfil eletroforético das etapas de purificação das proteínas recombinantes FimA (9A) e FliJ (9B). As colunas 1 e 2 representam as clones bacterianos antes e após a indução da expressão com IPTG. Após a ruptura por sonicação das células bacterianas o lisado obtido está representado nas colunas 3A e 3B. É possível observar nas colunas 2 e 3 a presença de banda correspondente às proteínas recombinantes juntamente com a proteína de fusão (GST), com massa molecular de 43 kDa (FimA) e 78 kDa (FliJ), sendo que a massa molecular da GST corresponde a 25 kDa. O lisado foi centrifugado e o perfil das proteínas presentes no sobrenadante está representado nas colunas 4 de ambas as figuras. Somente a FliJ permaneceu no sobrenadante (7B-4) e então purificada como se observa nas figura 9B-8. As proteínas recombinantes FimA (9A-4) e SefA não foram observadas na fração solúvel, sugerindo a presença dessas proteínas em corpúsculos de inclusão. Diante desses resultados, estudos aplicados na tentativa de solubilizar e renaturar essas proteínas se fizeram necessários e foi inicialmente alvo deste trabalho. Porém, dada a incerteza dos resultados e por requererem longos períodos de tempo para alcançar a renaturação adequada das proteínas, de forma a mantê-las solúvel e funcional, esses estudos foram considerados inviáveis.

Com purificação da proteína recombinante recFliJ utilizando a resina Glutathione Sepharose 4B com posterior clivagem da proteína de fusão por Trombina foi possível obter em média uma concentração de 0,85mg/mL mensurada por BCA.

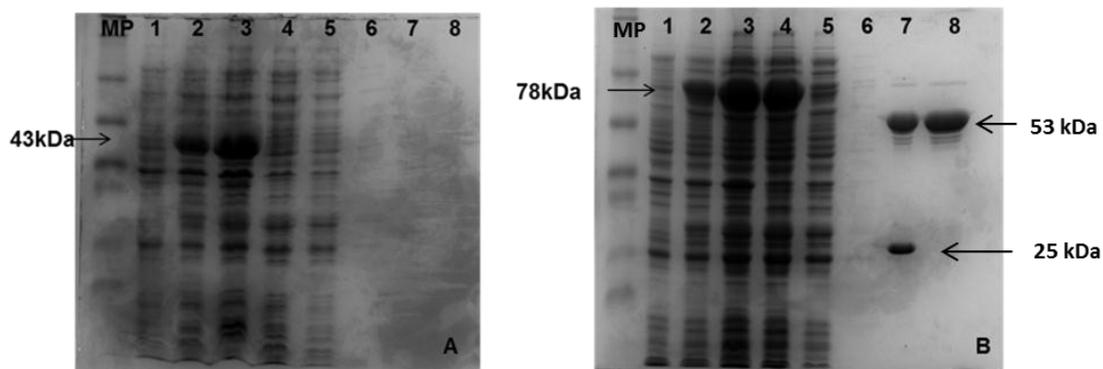


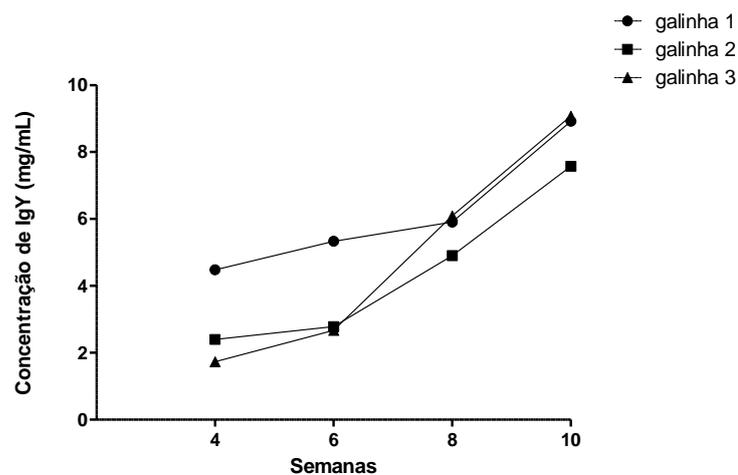
FIGURA 9. Perfil eletroforético das etapas de purificação das proteínas recombinantes FimA (A) e FliJ (B) de *S. Enteritidis* expressas em cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. MP – marcador de peso molecular Rainbow marker. 1: clones não induzidos (controle); 2: clones induzidos com IPTG; 3: lisado por sonicação; 4: sobrenadante; 5: FT (flow through) sobrenadante após 1 hora em contato com a resina de glutathione sepharose; 6: W (wash) sobrenadante após primeira lavagem da resina de Glutathione Sepharose 4B; 7: resina de Glutathione Sepharose 4B; 8: Proteina purificada, somente na 7B-8 com 53 kDa. SDS-PAGE a 12%

### 5.3.3.1 Concentração IgY

A produção média de IgY foi de  $4,82 \pm 2,01$  mg/mL para os ovos das galinhas durante todo o período experimental. Quando considerados os dados obtidos entre a 4ª e 6ª semanas e 7ª e 10ª semanas pós-imunização (SPI) entre todas as galinhas com a recF1jB, foi observada diferença significativa na produção de IgY após a 7ª SPI (Figura 10). Entre a 4ª e 6ª semana o rendimento médio observado foi de  $3,23 \pm 0,56$  mg/mL e entre a 7ª e 10ª semanas observou-se um rendimento médio de  $6,41 \pm 0,40$  mg/mL ( $p < 0,05$ ). Da 7ª semana em diante, os valores permaneceram aumentados até ao final do experimento (10ª semana).

Quando as galinhas foram avaliadas separadamente, entre a 4ª e 6ª semanas, as galinhas 1, 2 e 3 produziram uma média de  $4,9 \pm 0,6$  mg/mL,  $2,59 \pm 0,27$  mg/mL e  $2,20 \pm 0,66$  mg/mL, respectivamente, enquanto que a partir da 7ª semana a respectiva média foi de  $6,41 \pm 0,72$  mg/mL,  $6,24 \pm 1,89$  mg/mL e  $6,58 \pm 0,70$  mg/mL. Ao avaliar a produção de IgY individualmente, não foram observadas diferenças significativas entre os três galinhas entre a 4ª e 6ª semanas, bem como entre a 7ª e 10ª semanas ( $P < 0,05$ ).

Quanto aos ovos da ema, a produção de IgY apresentou rendimento médio de  $11,68 \pm 3,53$  mg/mL, correspondendo à concentração duas vezes maior que a concentração média obtida nos ovos das galinhas.



20

FIGURA 10: Concentração de IgY de ovos de galinhas obtida por BCA. Cinco doses de antígenos foram dadas com intervalos de 15 dias com a produção de proteínas totais medidas por 70 dias. Os valores foram obtidos usando diluição 1:25 das amostras purificadas por sulfato de amônia.

As frações de IgY purificadas das gemas de ovos de galinhas e emas foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de 5-12% na presença de SDS (Figura 11), foi possível observar, tanto em ovos de galinhas como no de ema, bandas bem marcadas com peso molecular de aproximadamente 23 e 70 kDa, correspondente às cadeias leve e pesada da IgY, respectivamente.

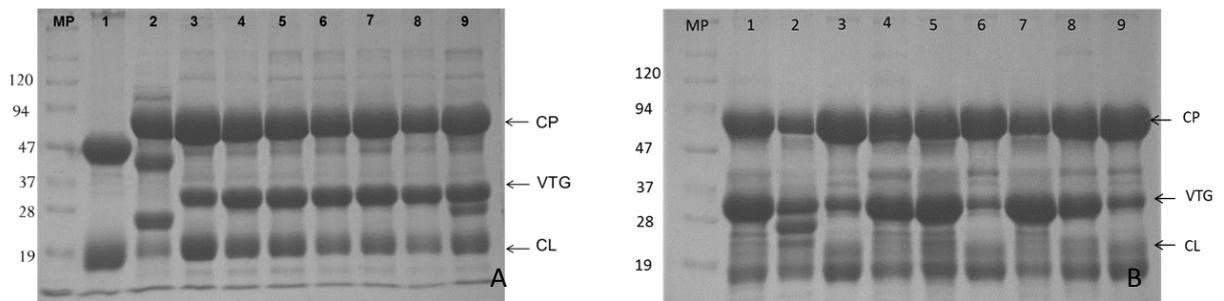


FIGURA 11: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras de IgY obtidas de preparações individuais de diferentes ovos de ema (2-9A) e galinhas (1-9B). MP - marcador de peso molecular. CP - cadeia pesada (65-70 kDa). CL - cadeia leve (23-25 kDa). VTG - impurezas que correspondem ao peso molecular de cerca de 35 kDa (provavelmente o fragmento C-terminal do precursor de vitelogenina II, (KLIMENTZOU *et al.*, 2006). A amostra 1A representa IgG anti-IgY de ema produzido em coelho.

### 5.3.3.2 Western blot

O reconhecimento da proteína recombinante F1jB foi realizado por *Western blot*, os anticorpos IgY produzidos em galinhas e ema reagiram com os antígenos formando bandas fortes e específicas (Figura 12).

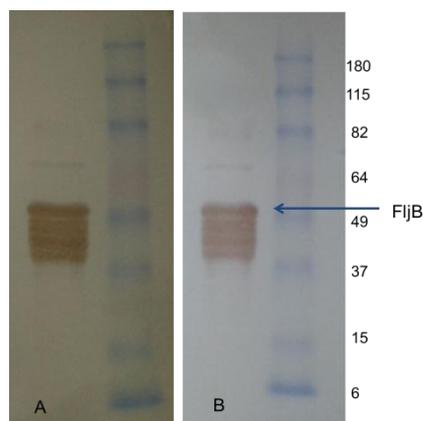


FIGURA 12: *Western blot* mostrando o reconhecimento da proteína recombinante F1jB - banda peptídica com massa molecular equivalente a 53 kDa por IgY anti-recF1jB produzidas em galinhas (A) e ema (B). PM: Marcador de peso molecular.

### 5.3.3.3 ELISA

A titulação de anticorpos IgY anti-recFljB no soro das aves foi realizada por ELISA antes de cada imunização e 15 dias após a última imunização. Nas figuras 13 e 14 observam-se os títulos obtidos em DO 492 nm para os soros das galinhas e emas, respectivamente, é possível verificar que todas as aves responderam satisfatoriamente e de forma semelhante ao antígeno.

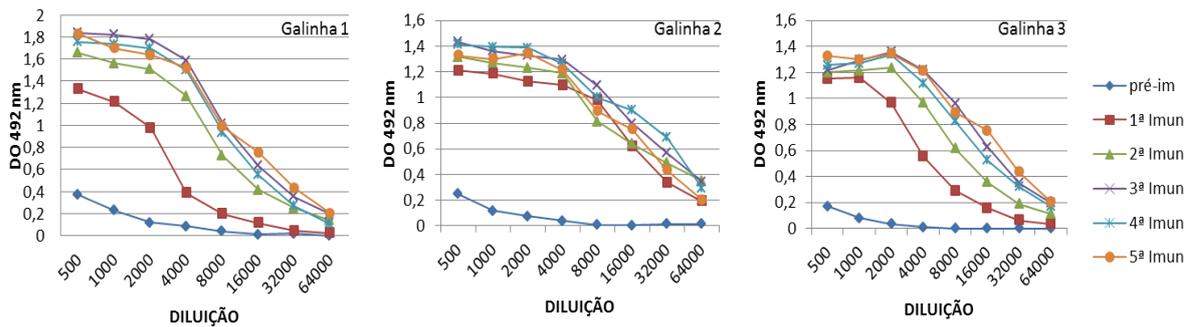


FIGURA 13: Titulação, por ELISA, dos anticorpos IgY anti-recFljB nos soros de galinhas, pré e pós imunizações, a partir de uma diluição de 1:500.

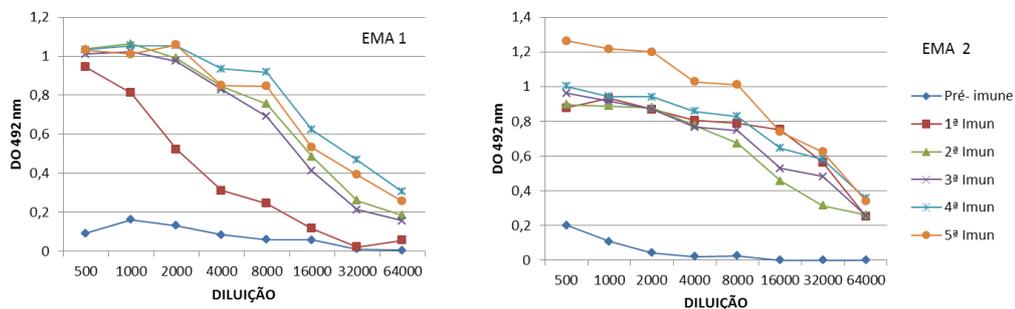


FIGURA 14: Titulação, por ELISA, dos anticorpos IgY anti-recFljB nos soros de emas, pré e pós imunizações, a partir de uma diluição de 1:500.

A Figura 15 mostra o perfil cinético da resposta imunológica observada nas gemas dos ovos das galinhas e ema durante o período experimental (onze semanas para as galinhas e 28 dias para a ema). Na 4ª semana houve um aumento considerável no título de anticorpos nas gemas dos ovos das galinhas, enquanto no anticorpo IgY de gema de ema foi observado um aumento significativo sete dias após a segunda imunização.

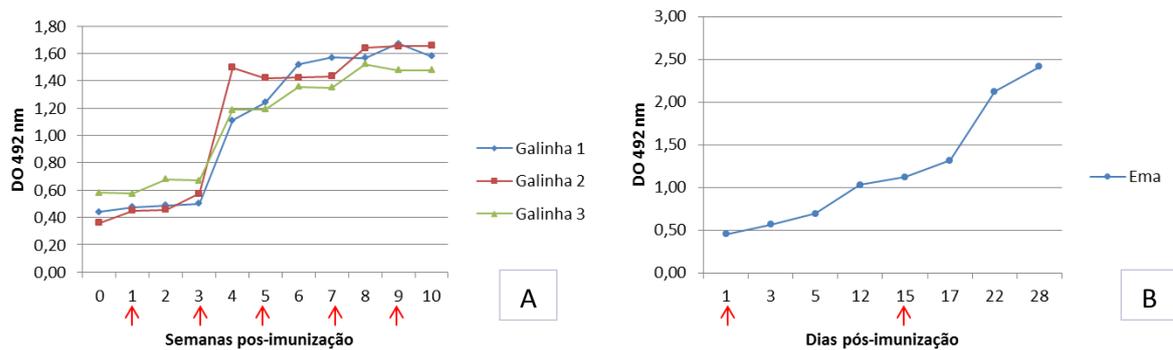


FIGURA 15: Cinética de produção de IgY nas amostras de gema de ovos de galinhas durante 10 semanas (A) e ema durante 28 dias (B) obtida pelo teste ELISA. As setas vermelhas indicam as imunizações com a proteína recombinante FljB. Os valores de densidade óptica obtidos foram expressos na diluição de 1: 100.

5

### 5.3.4 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti-recFljB sobre o crescimento, adesão e invasão de cepas de *salmonella in vitro*

#### 5.3.4.1 Inibição do crescimento

10

Avaliou-se a atividade biológica dos anticorpos IgY-anti-recFljB produzidos em galinhas e ema sobre o crescimento, *in vitro*, das cepas padrão de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em meio BHI com 0,3M de NaCl. Como controle negativo de inibição, foram utilizados os tratamentos branco (sem solução de IgY) e o pré-imune (PI), que continha anticorpos IgY antes das imunizações. O crescimento das bactérias foi acompanhado pelas leituras de densidade óptica (D.O) medida nos tempos zero, antes da incubação e a cada hora de incubação a 37°C. Foram testadas diferentes concentrações de IgY (1, 3, 5 e 10 mg/mL) frente a  $1,5 \times 10^7$  bactérias. A figura 16 apresenta as curvas de crescimento das bactérias em porcentagem, onde 100% equivalem à saturação do crescimento com DO =7,5 no densitômetro. No tempo zero a DO foi igual a zero para todos os tratamentos.

15

20

Para a cepa *S. Enteritidis* só foi possível visualizar a inibição significativa ( $P < 0,05$ ) do crescimento pelos anticorpos específicos produzidos em emas na concentração de 10 mg/mL, a partir de 5 horas de cultivo. No auge do crescimento, quando os grupos PI e Branco atingiram 100%, o grupo tratado com IgY específica teve um crescimento 27% menor.

25

Para a cepa de *S. Typhimurium* a partir de 3 mg/mL de IgY anti-recFljB, produzidos em emas, foi possível a inibição do crescimento dessa bactéria após 5 horas de cultivo ( $P < 0,05$ ). Quando as bactérias dos grupos controle e PI atingiram 100% de crescimento, as bactérias tratadas com 3, 5 e 10 mg/mL de IgY pós-imune tiveram seu crescimento inibido em 23%, 30% e 25%, respectivamente.

Os anticorpos IgY anti-recFljB obtidos dos ovos de galinhas, nas concentrações de 3 e 10 mg/mL reduziram em 21 e 28,7%, respectivamente, o crescimento de *S. Typhimurium* e novamente só a concentração de 10 mg/mL inibiu o crescimento de *S. Enteritidis* em 27% (Figura 17).

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos sem IgY e com IgY pré-imune.

- 5 O efeito da inibição do crescimento das cepas bacterianas pelos anticorpos produzidos em  
ema e galinhas também foram observados em meio sólido. Uma alíquota de 100  $\mu$ L dos cultivos após  
8 horas de incubação a 37°C foi diluída em série e plaqueada em ágar nutriente e após 24 horas as  
UFC foram contadas nas placas, com número de colônias dentro da faixa contável (30-300 UFC)  
independente da diluição. As figuras 18 e 19 ilustram o crescimento das cepas de *Salmonella* para os  
10 grupos controle (sem IgY) e tratados com IgY pré-imune e pós-imune.

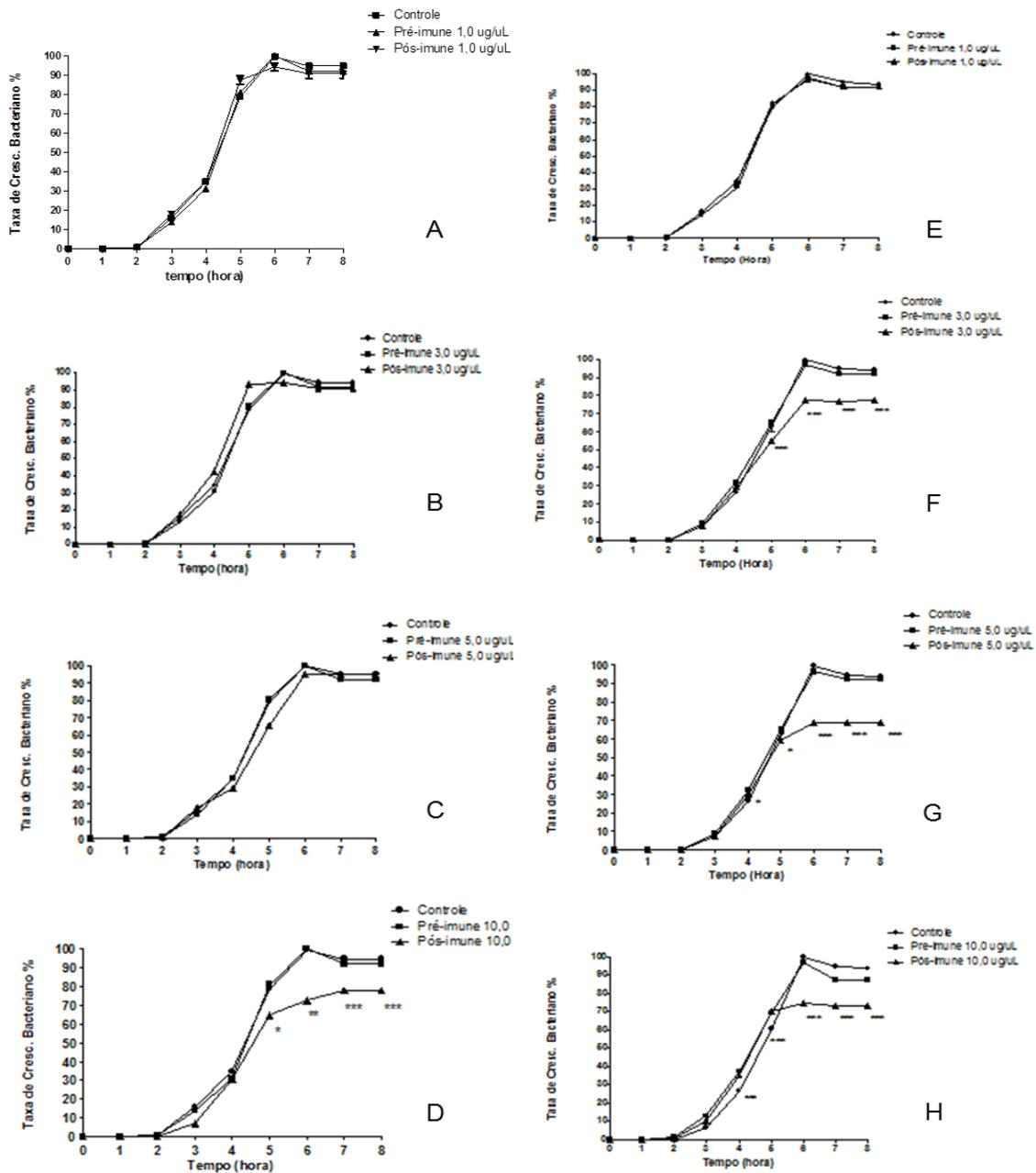
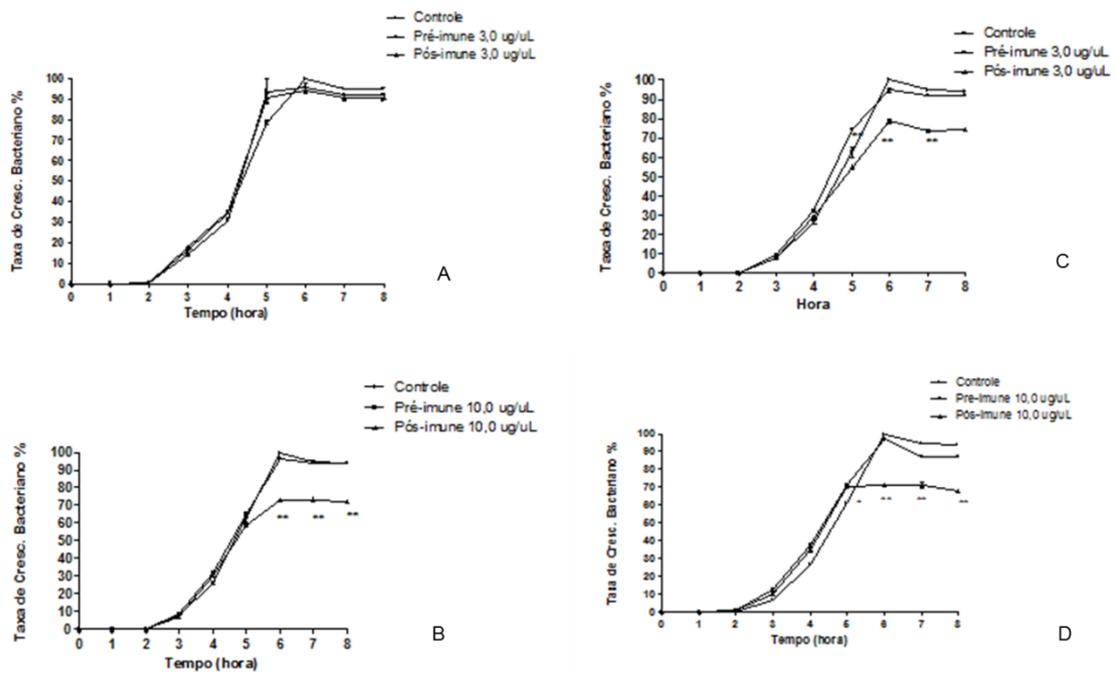


FIGURA 16. Efeito de diferentes concentrações de IgY anti-recFljB produzido em ema no crescimento de *S. Enteritidis* (A - D) e *S. Typhimurium* (E - H) em meio líquido.  $1,5 \times 10^7$  bactérias foram tratadas com IgY pós imune (▲), IgY pré imune (■) nas concentrações 1 mg/mL (A, E), 3mg/mL (B, F), 5 mg/mL (C, G) e 10 mg/mL (D, H) e um grupo não recebeu IgY: grupo Controle/Branco (●). Os valores equivalem a porcentagem das médias das densidades óticas (Densimat, bioMerieux, França) em triplicata de três experimentos independentes. Dentro de cada tempo de amostragem, médias de crescimento de bactérias diferem significativamente \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ).



5 FIGURA 17. Efeito de diferentes concentrações de IgY anti-recF1jB produzido em galinhas no crescimento de *S. Enteritidis* (A, B) e *S. Typhimurium* (C, D) em meio líquido.  $1,5 \times 10^7$  bactérias foram tratadas com IgY pós imune (▲), IgY pré imune (■) nas concentrações de 3mg/mL (A, C) e 10 mg/mL (B, D) e um grupo não recebeu IgY: grupo Controle/Branco (●). Os valores equivalem a porcentagem das médias das densidades óticas (Densimat, bioMerieux, França) em triplicata de três experimentos independentes. Dentro de cada tempo de amostragem, médias de crescimento de bactérias diferem significativamente \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ).

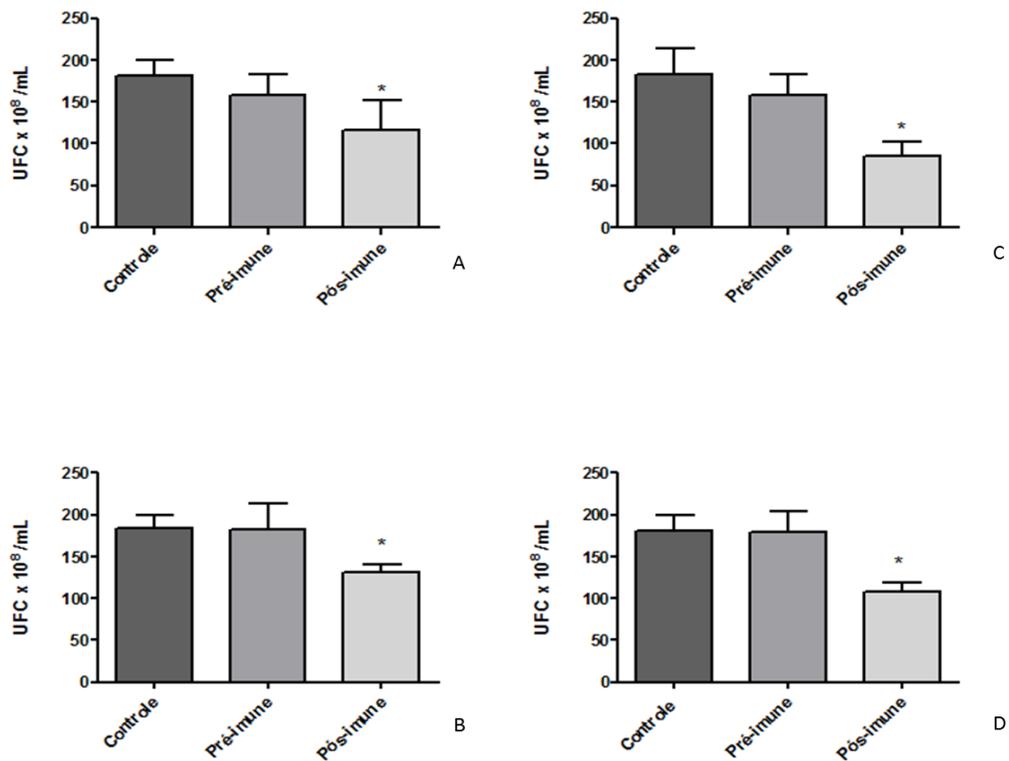


FIGURA 18: Efeito da IgY anti-recFliJ no crescimento de *S. Enteritidis* (A,B) e *S. Typhimurium* (C,D) produzidos em ema (A, C) e galinhas (B, D) observados pela diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do número de UFC nos grupos tratados com IgY específica (pós-imune) comparado com os grupos controle (sem IgY) e pré-imune (IgY inespecífica). As barras verticais indicam o desvio padrão. Valores percentuais obtidos a partir das médias de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas. \*Percentual de aderência diferente significativamente ( $p < 0,05$ ). A concentração de igY para a cepa de *S. Typhimurium* foi de 3,0 mg/mL e para *S. Enteritidis* foi de 10 mg/mL.

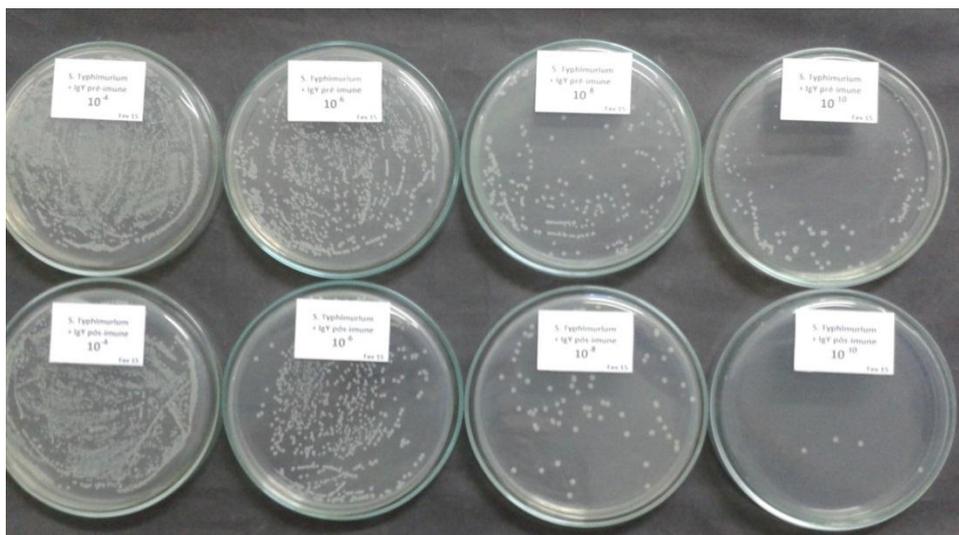
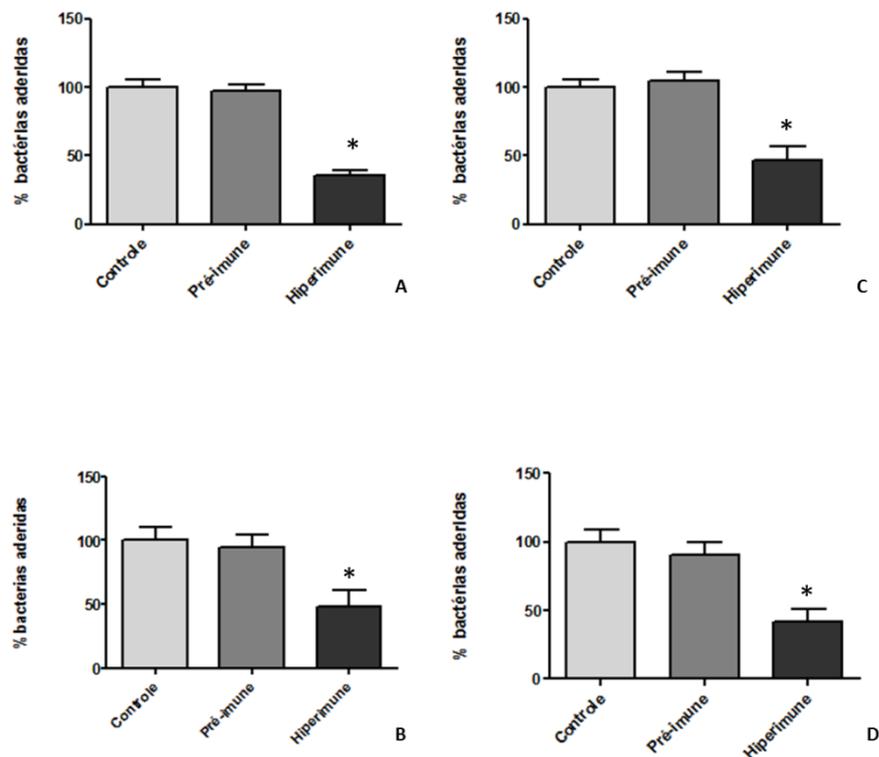


FIGURA 19: Comparação do crescimento de *S. Typhimurium* tratadas com IgY pré-imunização (parte superior) e IgY anti-recFliJ (parte inferior) em Ágar Nutriente em diferentes diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$ ). Concentração de igY foi de 3,0 mg/mL.

## 5.3.4.2 Teste de adesão

A aderência das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* na presença da imunoglobulina Y antiflagelina de *Salmonella* (IgY anti-recFliJ) produzidas em ema e galinhas hiperimunizadas foi testada em células Caco-2. A porcentagem das bactérias aderidas foi medida comparando grupo de células não tratadas com IgY (controle) e com IgY inespecífica (IgY pré-imune) (Figura 20). A presença da IgY anti-recFliJ produzida tanto em ovos de ema quanto de galinha diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ), aproximadamente 50%, a aderência das duas cepas de *Salmonella* nas condições testadas. Nas figuras 21 e 22 é possível visualizar a proporção de UFC de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* aderida à superfície das células Caco-2, respectivamente, após tratamento com IgY anti-recFliJ (pós-imune) em ágar nutriente após 24 horas de cultivo a 37°C. Para efeito de comparação ainda são demonstrados os crescimentos das cepas sem IgY (controle) e com IgY inespecífica, obtida nos ovos antes das imunizações (pré-imune).



15

FIGURA 20: Efeito da IgY anti-recFliJ, produzidas em ema (A, C) e galinhas (B, D), na aderência de *S. Enteritidis* (A, B) ou *S. Typhimurium* (C, D) em monocamada de células caco-2. As barras verticais indicam o desvio padrão. Valores percentuais obtidos a partir das médias de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas. \*Percentual de aderência diferente significativamente ( $p < 0,05$ ).

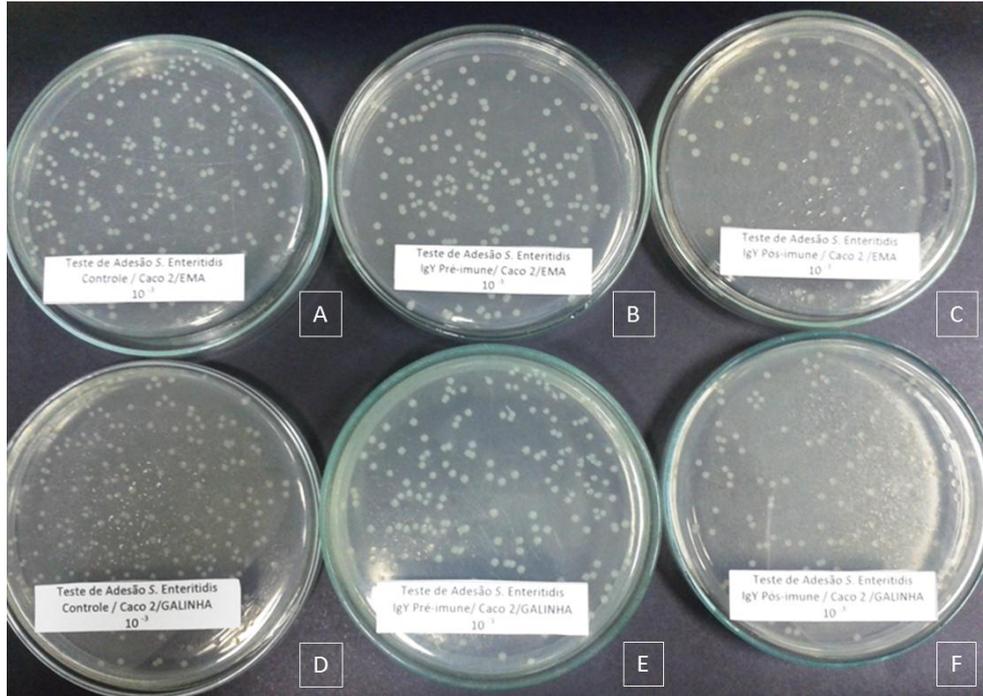


FIGURA 21. Efeito da IgY anti-recFliB, produzidas em ema (A-C) e galinhas (D-F), na aderência de *S. Enteritidis* em ágar nutriente na diluição  $10^{-3}$ . A, D – controle (sem IgY); B, E: Pré-imune (IgY inespecífica) e C,F: Pós-imune (IgY anti-recFliB).

5

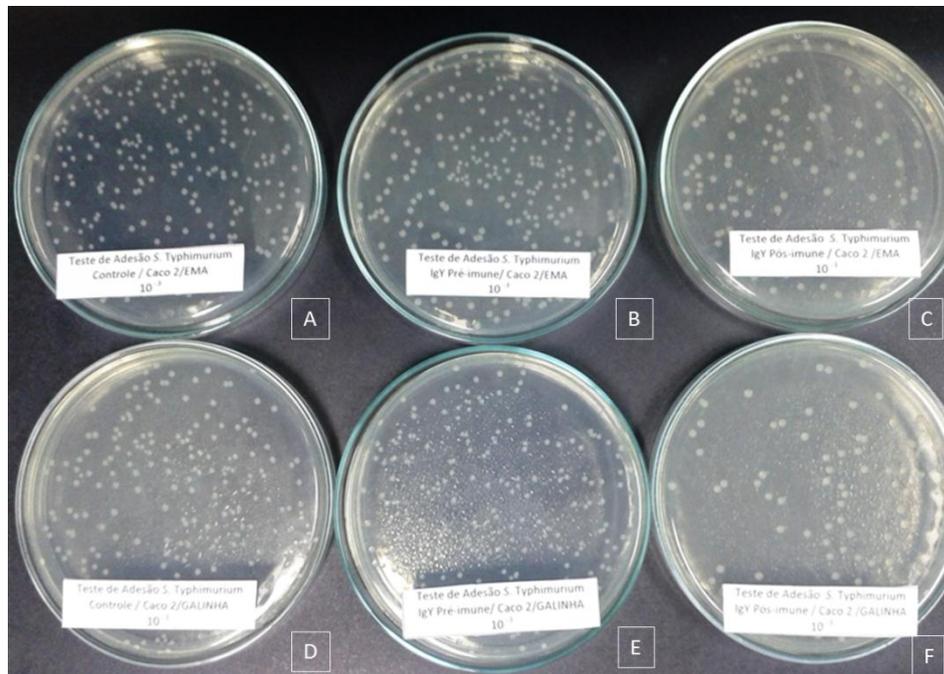
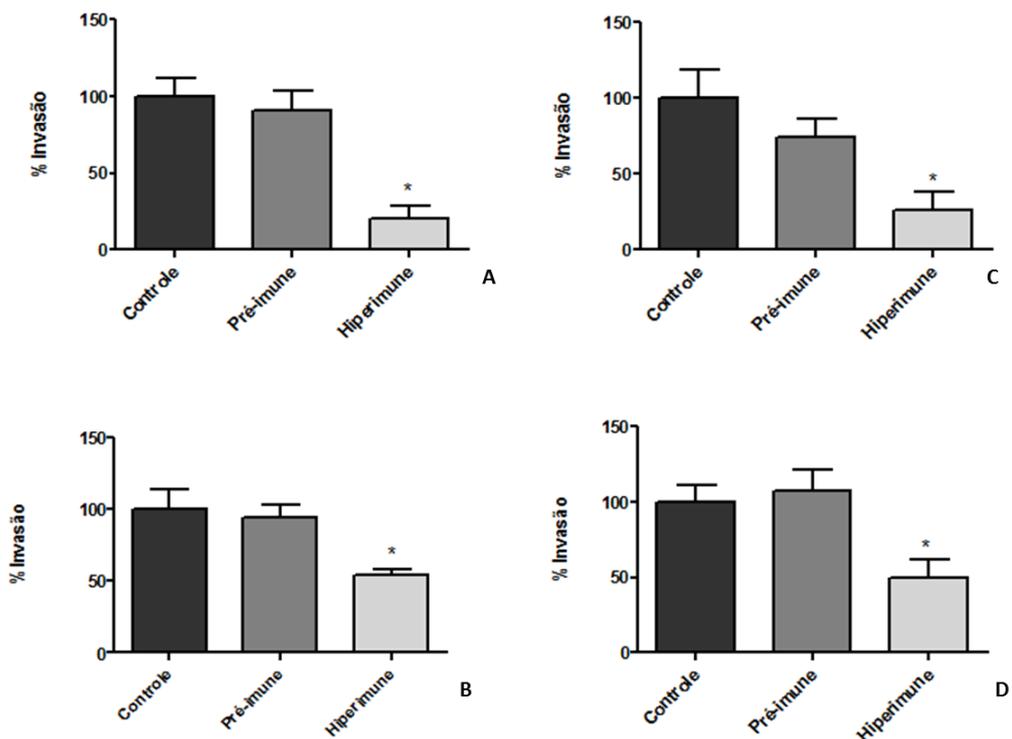


FIGURA 22. Efeito da IgY anti-recFliB, produzidas em ema (A-C) e galinhas (D-F), na aderência de *S. Typhimurium* em ágar nutriente na diluição  $10^{-3}$ . A, D – controle (sem IgY); B, E: Pré-imune (IgY inespecífica) e C,F: Pós-imune (IgY anti-recFliB).

10

### 5.3.4.3 Teste de invasão

A eficiência da invasão das cepas SE e ST na presença da IgY anti-recFljB produzida em ovos de ema ou galinhas diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em células HT-29 (Figura 23). A IgY produzida em ovo de ema diminuiu 79,7 e 74,1%, respectivamente, a capacidade de invasão da *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* comparado ao grupo sem IgY (Figura 23A e 23C), enquanto para o anticorpo produzido nos ovos de galinhas a eficiência de invasão diminuiu 46,3 e 50,5% para as respectivas bactérias (Figura 23B e 23D). Nas figuras 24 e 25 é possível observar a quantidade de UFC de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* endocitadas pelas células HT-29, respectivamente, após tratamento com IgY anti-recFljB (pós-imune) em ágar nutriente após 24 horas de cultivo a 37°C. Para efeito de comparação ainda são demonstrados os crescimentos das cepas sem IgY (controle) e com IgY obtida nos ovos pré-ímmunes. É possível observar o menor número de colônias nas placas onde os cultivos foram tratados com o anticorpo antíflagelina de *Salmonella*.



15 FIGURA 23: Eficiência da invasão das cepas *S. Enteritidis* (A, B) e *S. Typhimurium* (C, D) tratadas com IgY anti-recFljB (hiperímmune) produzidos em ovos de ema (A, C) e galinhas (B, D) em células HT-29. . As barras verticais indicam o desvio padrão. Valores percentuais obtidos a partir das médias de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas. \*Percentual de invasão diferente significativamente ( $p < 0,05$ ).

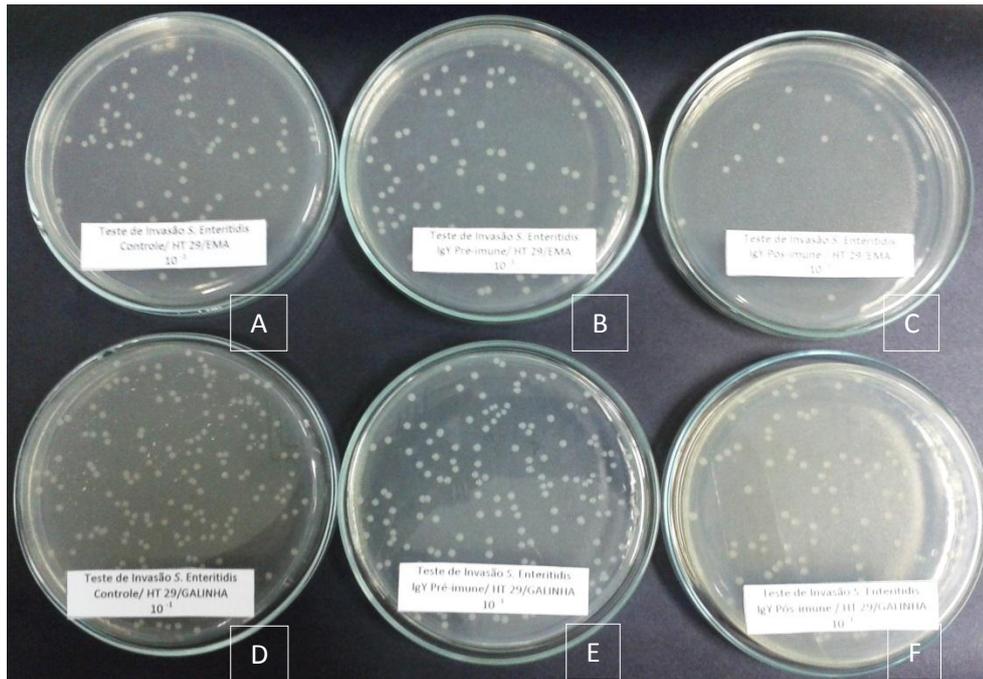


FIGURA 24. Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema (A-C) e galinhas (D-F), na invasão de *S. Enteritidis* em ágar nutriente na diluição 10<sup>-1</sup>. A, D – controle (sem IgY); B, E: Pré-imune (IgY inespecífica) e C,F: Pós-imune (IgY anti-recFljB).

5

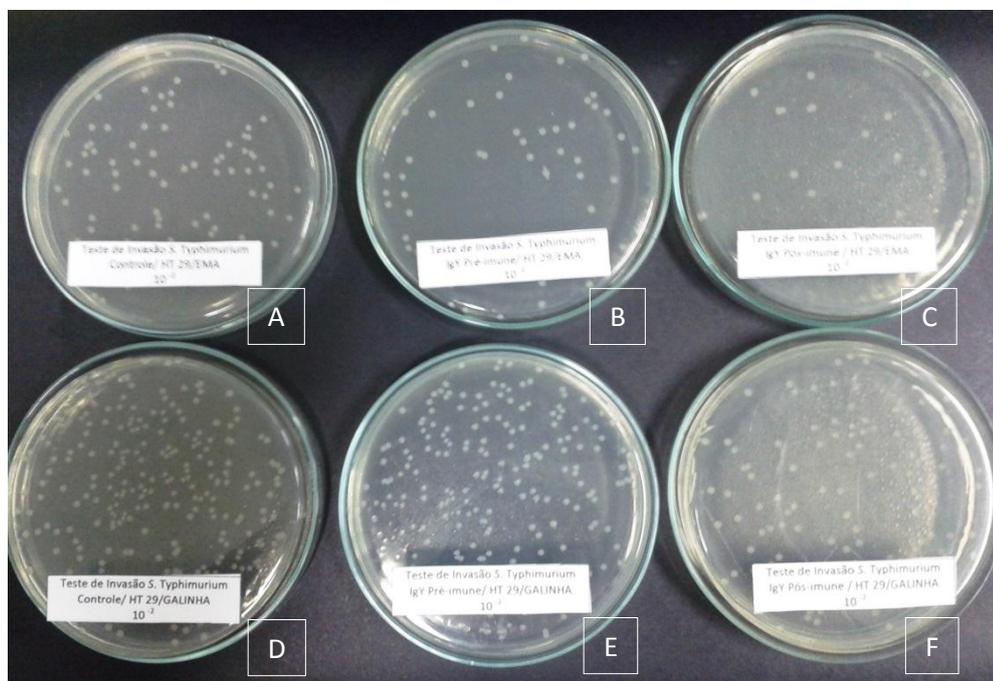


FIGURA 25. Efeito da IgY anti-recFljB, produzidas em ema (A-C) e galinhas (D-F), na invasão de *S. Typhimurium* em ágar nutriente na diluição 10<sup>-2</sup>. A, D – controle (sem IgY); B, E: Pré-imune (IgY inespecífica) e C,F: Pós-imune (IgY anti-recFljB).

10

## 5.4 DISCUSSÃO

Durante o processo de imunização as galinhas e o caprino permaneceram saudáveis durante todo o experimento sem nenhuma interferência nos hábitos alimentares ou postura, no caso das galinhas. Os coelhos e emas apresentaram lesões nos locais de aplicação dos antígenos mesmo dividindo as aplicações em 2-3 pontos diferentes e com baixos períodos de manipulação. Bollen & Hau (1999) associam as lesões granulomatosas nos locais de inoculação ao adjuvante completo de Freund. A ausência de efeitos adversos tem sido descrito em muitos estudos com produção de IgY em galinhas, independente do tipo antígeno usado (LEVESQUE *et al.* 2007, WITKOWSKI *et al.* 2009, DE PAULA *et al.* 2011, SANTOS *et al.*, 2014). Em mamíferos, os efeitos adversos e lesões são usualmente descritas no processo de imunização (LEENAARS *et al.*, 1999). Neste estudo observou-se a redução na postura em uma das três emas imunizadas e a total interrupção da postura nas outras duas aves, após a primeira etapa de imunização. Contudo, os resultados mostraram titulação de IgY, tanto no soro como nas gemas, compatíveis com a titulação do lote de galinhas utilizadas. Algumas pesquisas relatam a redução ou a interrupção na capacidade de postura em galinhas imunizadas com diferentes antígenos para produção de anticorpos (SCHNIERING *et al.*, 1996; SCHADE *et al.*, 2005; LEVESQUE *et al.*, 2007). Acredita-se que o fato das emas serem criadas de forma semi-intensiva e por não estarem suficientemente manejadas para tais intervenções, o *stress* pode ser o principal fator que contribuiu para o fim da postura como descrito por Schade *et al.* (2005) e, conseqüentemente, limitando a produção de IgY.

A utilização de anticorpos específicos produzidos em mamíferos contra alvos antigênicos e marcadores celulares são ferramentas essenciais para o estudo das relações parasita-hospedeiro. Infelizmente, a obtenção desses anticorpos não é tão simples, pois depende do sangramento animal a fim de recuperar as imunoglobulinas desejadas (SCHADE *et al.*, 2005). A utilização de ovos de aves na produção de anticorpos diminui a intervenção na experimentação com mamíferos que são usados para essa finalidade (JUSTIZ VAILLANT *et al.*, 2012).

Geralmente, a IgY na gema surge em torno do 7º ao 10º dia após seu surgimento no soro, de forma dependente da concentração destes no soro (PEI & COLLISSON, 2005; TAVARES *et al.*, 2013). As gemas dos ovos contêm grandes quantidades de IgY transferidos passivamente pelas aves. Em galinhas são descritas concentrações variando entre 2-8 mg/mL após purificação, e estimou-se que 2-10% dos anticorpos totais da gema são específicos ao antígeno (SCHADE *et al.*, 2005; GREUNKE *et al.*, 2008).

No presente estudo, a concentração de anticorpos obtida a partir da gema de ovos de galinhas apresentou um rendimento médio de 4,82 mg/mL, o que foi compatível com os resultados disponíveis na literatura. A média descrita nesse experimento foi semelhante à descrita por Ferreira Junior *et al.*, (2012) e Nafea *et al.* (2015) usando a mesma metodologia e superior à obtida por Araujo (2007). A grande variação nas concentrações de IgY obtida por diferentes estudos pode estar relacionada principalmente com as diferentes metodologias empregadas na purificação e ainda dentro de uma mesma técnica, como por exemplo, diferentes concentrações do sal usado na precipitação das mesmas (ARAUJO, 2007). Outras variáveis podem estar relacionadas com o tipo e a dose de antígeno, o adjuvante, a via de administração, o número de imunizações, a genética do animal, condições fisiológicas individuais e o tipo de criação (SCHADE *et al.*, 2005; GREUNKE *et al.*, 2008).

A média de IgY obtida nas gemas dos ovos de ema (11,68 mg/mL) foi superior à média obtida em ovos de galinha com 4,82 mg/mL, pela técnica de precipitação por sulfato de amônio. Um ovo de ema contém, em média, 175 ml de gema (dados não apresentados). De acordo com Silva (2001), em condições favoráveis, uma fêmea põe em média de 25 a 40 ovos, por ano, variando de acordo com fatores individuais, qualidade genética, nutrição e potencial reprodutivo. Deste modo, segundo os resultados dessa pesquisa, uma fêmea pode render até sete litros de gema o que poderia render até 82 g de IgY por ano. A concentração de IgY em ovos de emas não foi até aqui relatada na literatura, sendo assim não foi possível obter algum parâmetro de comparação, porém em ovos de avestruz, Tobias (2011) obteve altas concentrações de IgY que variaram de 72,66 mg/mL a 316,49 mg/mL, extraídas por sulfato de amônio a 20% e sulfato de sódio 19% após imunização com diferentes antígenos bacterianos.

Na literatura há escassez de informações sobre imunoglobulinas de emas. Montagna *et al.* (2014) precipitaram IgY de ovos de ema com polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) e até então foram os únicos que descreveram duas bandas com 25 e 65 kDa, correspondentes às cadeias leve e pesadas da respectiva imunoglobulina. Nesse estudo a massa molecular encontrada para IgY extraída da gema dos ovos de emas em condições redutoras apresentou bandas com aproximadamente 23-30 kDa e 65-70 kDa, correspondentes às cadeias leve e pesadas da imunoglobulina, respectivamente. Na figura 1 é possível observar a IgY de ovo de ema purificado por coluna de afinidade, com a cadeia leve apresentando massa maior que 30 kDa. Contudo, quando a purificação foi realizada por sulfato de amônio 29% (Figura 9A) a respectiva cadeia leve se apresentou com massa molecular entre 23-25kDa, sugerindo que a divergência observada no tamanho da cadeia leve, desse estudo e na pesquisa de Montagna *et al.* (2014) pode estar relacionada com o tipo de purificação. Diraviyam *et al.*, (2014)

relatam a grande heterogeneidade nas metodologias de purificação de IgY ao revisarem diversos estudos sobre tal imunoglobulina.

Os antissoros de ema produzidos em coelhos e caprino marcados com biotina apresentaram maior especificidade com soros de emas e das outras ratitas (avestruz e emu) e menos com o soro de galinha. Por outro lado, os soros das espécies de mamíferos testadas não apresentaram nenhuma reação frente ao conjugado antiema produzido neste trabalho. Resultados semelhantes foram observados por Tobias (2011) que produziu antissoro de avestruz em coelho e cabra. Essas informações corroboram com Fernandes *et al.* (2010) que afirmaram que o uso de kits comerciais produzidos para uso específico em galinhas apresentam pouca especificidade para avestruz e outras espécies de aves. Sendo assim a produção de soros anti-IgY de emas, torna-se uma alternativa indispensável para estudos soro-epidemiológicos e para programas de defesa de preservação da espécie, até porque informações sobre doenças infecto-contagiosas em emas e outras ratitas (exceto em avestruzes) são escassas, e nos kits comerciais existentes para detecção de doenças nessas aves são utilizados anticorpos antigalinha que são considerados menos específicos ou até mesmo não reagentes com anticorpos de emas.

Diversos estudos comprovaram o alto potencial imunogênico da proteína FljB em mamíferos (PINO *et al.*, 2005; MASSIS, 2007; BRAGA *et al.*, 2008; NEMPONT *et al.*, 2008; SKOUNTZOU *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2014) e essa característica foi fundamental na escolha da flagelina para a produção de IgY específica em ovos de ema e galinhas. Essa é a primeira vez que a flagelina FljB recombinante é utilizada como antígeno para a produção de imunoglobulina em aves com objetivo de atenuar ou cessar a patogenicidade de *Salmonella entérica in vitro*. Segundo Mizel & Bates (2010), o potencial dessa proteína fascinante parece ser quase ilimitado.

O sistema de clonagem e expressão do gene *fljB* utilizado nesse estudo foi eficiente e capaz de produzir clones produtores de flagelina FljB. Huyen *et al.* (2014) obtiveram sucesso ao amplificar o gene *fljB* por PCR do DNA genômico de *S. Typhimurium* e expressar em *E. coli* BL21 a respectiva proteína fusionada com Trx (tiorredoxina), obtida após inserção em pET32A. Hao *et al.* (2014) usaram o mesmo sistema, porém para expressar a flagelina recombinante FliC com sucesso semelhante. Soares *et al.* (2014) também obtiveram sucesso ao clonarem um fragmento do gene *fljB* de *Salmonella Typhimurium*, porém em outro vetor (pET100/D-TOP 0) para transformar células de *E. coli* TOP10 para a expressão da flagelina. Portanto podemos sugerir o uso do sistema de clonagem e expressão aqui empregado para a produção de clones recombinantes produtores dessa flagelina.

Essas moléculas são também investigadas como potencial adjuvante para uso em vacinas na indução de resposta imune humoral e celular para diferentes antígenos alvo. A eficiência dessa proteína como adjuvante tem sido comprovada em diferentes formulações de vacinas virais e bacterianas (MIZEL & BATES, 2010). Braga *et al.* (2008) ao estudar três flagelinas de *Salmonella*,  
5 dentre elas a FliB, observaram que essas proteínas são dotadas de efeitos adjuvantes tipo-específico frente a células T CD8+ *in vivo*, uma característica que pode gerar impactos no uso dessas proteínas como adjuvantes em vacinas profiláticas ou terapêuticas. Além disso, FliB pode desempenhar um papel importante como componente principal para a formulação de vacina pelo reconhecido potencial do seu uso para melhoria de muitas vacinas existentes, incluindo aquelas empregadas em avicultura industrial  
10 (MIZEL & BATES, 2010).

Com a primeira imunização, ou seja, com 15 dias foi observado grande aumento nos títulos de anticorpos específicos anti-recFliB, nos soros das emas e também nos soros das galinhas. Esses resultados corroboram os obtidos por pesquisadores que também observaram altos títulos de IgY produzidos em galinhas duas semanas pós-imunizações (ALMEIDA *et al.*, 1998, TOBIAS, 2011,  
15 TAVARES *et al.*, 2013), porém discordam de Ferreira Junior *et al.* (2012) e Bernardo (2009) que só encontraram níveis detectáveis de IgY específica em soros de galinhas imunizadas com antígenos de *Toxoplasma gondii* e *Leishmania amazonensis* somente após a segunda imunização.

Ibarra *et al.* (2004) ao estudarem a SPI-1 em *S. Typhimurium* após crescimento em ambiente aerado e com microaerofilia, por meio da análise do transcriptoma verificou que o gene *fliB* foi induzido  
20 em condições de alta aeração e alta osmolaridade, com significativo aumento da presença física dos flagelos. Esses autores sugerem uma correlação entre a indução da SPI-1 com um aumento na expressão, motilidade e quimiotaxia da flagelina. Shah *et al.* (2011) utilizaram 300 mM de NaCl no meio de crescimento para induzir a expressão da SPI-1 de diversos isolados de *Salmonella* Enteritidis e ainda identificaram um aumento na motilidade das cepas promovido pelo maior número de flagelos.  
25 Por análise em SDS-PAGE, os autores identificaram a expressão das cinco principais bandas das proteínas secretadas, e após o sequenciamento dos aminoácidos, corresponderam à expressão de proteínas efectoras e de montagem do SPI-1 SSTT (SipA - 74 kDa e SipD - 36 kDa) e proteínas flagelares (FlgK - 59 kDa, FliB - 52 kDa e FlgL - 34 kDa).

A correlação entre SPI-1 e FliB também foi reforçada na pesquisa de Eom *et al.* (2012) ao  
30 estudarem a proteína ACP (proteína transportadora de acila), um cofator metabólico essencial para o transporte de acila durante a síntese de ácidos graxos e codificada em um locus gênico da SPI-1, responsável pela secreção e translocação de proteínas efectoras do SSTT, relataram que os níveis de

secreção de FljB, regulada pela variação de fase flagelar ( FliC para FljB), foram maiores quando as cepas de *S. Typhimurium* cresceram em meio com condições indutoras de SPI-1 (contendo 0,3 M de NaCl). O comprimento dos filamentos e a quantidade de flagelos são consideravelmente afetados pela concentração de NaCl do meio de crescimento bacteriano (SAITO *et al.*, 1998). Na concentração de 2% de NaCl tornou-se evidente o aumento no número de flagelos efetivamente mais compridos e com maior motilidade (por força protônica) dos mesmos. Oliveira *et al.* (2011) observaram que o cultivo de *S. Typhimurium* sob forte agitação (240 rpm) aumentou o crescimento e expressão de flagelina.

O reconhecimento do risco de surgimento da resistência aos antimicrobianos tem proporcionado uma incessante busca de estratégias alternativas, que sejam viáveis, no combate aos microrganismos patogênicos, para o tratamento de doenças que não respondem à terapia medicamentosa e para indivíduos com comprometimento do sistema imune que são incapazes de responder às vacinas convencionais (KOVACS-NOLAN & MINE, 2012). Com isso, vários trabalhos apontam para a necessidade de antibióticos de última geração. Portanto, novas abordagens para substituir os antibióticos são atualmente indispensáveis para a luta contra patógenos (DIRAVIYAM *et al.*, 2014). Anticorpos IgY exercem uma atividade antimicrobiana contra patógenos por ligação, imobilizando e, conseqüentemente, reduzindo ou inibindo o crescimento ou a capacidade formadora de colônia de bactérias patogênicas, sendo assim, considerada uma excelente alternativa para os antibióticos (SONG *et al.*, 2009).

Neste estudo, o efeito inibidor do crescimento de *Salmonella Enteritidis* e *S. Typhimurium* na presença de IgY específica foi dependente da concentração e marcadamente observado durante a fase exponencial (4-6 horas de período de incubação). Esse resultado é compatível com o obtido com a preparação IgY dirigido para *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* (LEE *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2009, NEEMA & SHIM, 2012). O mecanismo pelo qual IgY pode suprimir o crescimento bacteriano não está claro. Lee *et al.* (2002) e Sunwoo *et al.* (2002) relataram que o efeito inibitório do crescimento *in vitro* provocado pela presença de IgY específica, respectivamente, em *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 pode ser elucidado pela capacidade de ligação de IgY específica contra estes microrganismos. Suas observações microscópicas revelaram alterações estruturais da superfície bacteriana associadas à IgY específicas. Esses estudos *in vitro* sugerem que a IgY pode se ligar a moléculas específicas na superfície bacteriana que são cruciais para o crescimento bacteriano e podem estar levando à deterioração funcional desses componentes.

Os resultados aqui observados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram a inibição do crescimento de bactérias patogênicas por preparações específicas de IgY (SUGITA-

KONISHI *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2002; SUNWOO *et al.*, 2002; AMARAL *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; CHALGHOUMI *et al.*, 2009, NEEMA & SHIM, 2012; TOBIAS *et al.*, 2012).

A flagelina não é essencial para a sobrevivência da salmonela, sendo assim, se tornam necessários mais estudos que melhor caracterizam o efeito da IgY sobre a flagelina bacteriana responsável pela diminuição da densidade ótica em meio líquido e diminuição no número de UFC em meio sólido. Silva & Tambourgi (2010) revisaram o efeito de aglutinação e precipitação de antígenos na presença de IgY e, de acordo com esse estudo, existe a possibilidade da formação de um aglomerado bacteriano na presença da IgY anti-FljB o que pode ser a causa do menor número de UFC e menor densidade ótica, aqui caracterizado como inibição do crescimento dessas espécies.

O processo de infecção intestinal por *Salmonella* pode ser reproduzido *in vitro* utilizando cultura de células de origem epitelial (ROSENSHINE *et al.*, 1994). As linhagens de células intestinais humanas Caco-2 e HT-29, que foram isoladas a partir de adenocarcinomas do cólon, são as mais amplamente utilizadas para os estudos *in vitro* (Cencic & Langerholc, 2010; Zweibaum *et al.*, 2011; GAGNON *et al.*, 2013). A linhagem celular Caco-2 forma monocamadas em cultivo e diferencia-se em células com elevada homologia aos enterócitos no epitélio intestinal (PINTO *et al.*, 1983; ROUSSET, 1986). As células em cultura HT-29 são heterogêneas com pequena proporção (isto é, <5%) de células secretoras de muco e de células colunares de absorção (HUET *et al.*, 1995). Gagnon *et al.* (2013), ao compararem a infecção de diferentes sorovares de *Salmonella* em células de cólon humano (Caco-2, HT-29 e HT29-MTX), não observaram diferença significativa para experimentos de aderência das cepas de Salmonela entre as linhagens HT-29 e Caco-2, porém a capacidade de invasão das cepas estudadas foi significativa maior na linhagem HT-29 comparado com a Caco-2. Baseado nessas observações, essas linhagens foram selecionadas para os respectivos testes.

Os experimentos de adesão e invasão foram aqui conduzidos como nos experimentos de Gagnon *et al.* (2013), porém com uma etapa prévia na qual um grupo com as cepas de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* foram cultivadas, por uma hora, na presença de IgY anti-recFljB e outro grupo com IgY inespecífica produzidas em ovos de emas e galinhas. Diferentemente nos experimentos de Chalghoumi *et al.* (2009), IgY específica (anti-OMP de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*) e inespecíficas foram adicionadas diretamente na monocamada de células Caco-2 para avaliar o efeito das mesmas na adesão das respectivas bactérias.

Nessa pesquisa observou-se que *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) previamente tratadas com IgY específica tiveram a capacidade de aderência (células Caco-2) e de invasão (células HT-29) inibidas. Foi possível visualizar uma redução de 50% na aderência de SE e ST em células

Caco-2 tratadas com IgY anti-recFliB na concentração de 10 mg/ml e redução ainda maior na invasão de SE e ST em células HT -29 quando tratadas com IgY específicos em ovos de emas, quando comparados com IgY produzido em ovos de galinhas (figuras 21). Essa redução pode ser devida ao efeito inibidor superior daqueles anticorpos. Nos experimentos de Chalghoumi *et al.* (2009), a adesão de SE e ST na monocamada de células Caco-2 foi fortemente reduzida por IgY específica de uma forma dependente da concentração. Os autores relatam que o mecanismo de inibição da adesão bacteriana por IgY específica não é precisamente compreendida. A redução na capacidade de adesão *in vitro* na presença de IgY específica também foi observada por Sugita-Konishi *et al.* (1996), Deignan *et al.* (2001), Girard *et al.* (2006), Chalghoumi *et al.* (2009).

A ligação específica de IgY com antígenos específicos na superfície bacteriana pode ser um importante mediador da inibição da adesão e invasão bacteriana. É importante lembrar que IgY utilizada neste estudo foram especificamente dirigidas contra uma proteína do flagelo de *Salmonella*. Acontece que a ligação de *Salmonella* com a célula epitelial é mediada por proteínas conhecidas coletivamente como adesinas (BEACHY, 1981), porém as flagelinas são proteínas flagelares que têm sido citadas em alguns estudos com função de adesinas (HAIKO & WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013). Flagelos estão envolvidos na adesão e invasão bacteriana de forma indireta, através do fornecimento de motilidade em relação a células alvo e receptores, e diretamente por aderir a estes alvos. Para Allen-Vercoe & Woodward (1999), o ensaio de adesão com cepas de *S. Enteritidis* sugeriu que os flagelos foram mais importantes para a adesão do que para motilidade. Rossez *et al.* (2015) relacionam a força de rotação dos flagelos da *S. Typhimurium* com a interação com células HeLa em um processo chamado *near-surface swimming* (nadar perto da superfície). Haiko & Westerlund-Wikström (2013) relatam que a motilidade promovida pelo flagelo de *S. Enteritidis* está indiretamente associada ao aumento da capacidade de invasão em células Caco-2, Hep-2 e em *S. Typhimurium* é importante na adesão e invasão em células intestinais. Por outro lado, Elhadad *et al.* (2015) relatam que *S. Typhimurium* requer um flagelo funcional para a invasão em células epiteliais e para a captação por macrófagos em um mecanismo independente de motilidade e que os flagelos foram considerados dispensáveis para a adesão em célula hospedeira.

## 5.5 CONCLUSÕES

- Anticorpos policlonais IgY produzidos e extraídos de gemas de ovos de emas apresentaram um bom potencial para a utilização como imunoterápico e ferramenta para imunodiagnóstico importante para essa espécie animal;
- Os anticorpos IgG biotinizados anti-IgY de emas produzidos em coelhos e caprino apresentaram especificidade para o reconhecimento de anticorpos de ema superior ao de antigalinha;
- O sistema de clonagem e expressão do gene *fljB* (pGEX – 4T-1 em *E.coli* BL21 (DE3) pLysS) foi eficiente e capaz de produzir clones da flagelina FljB com poder imunogênico significativo nos animais utilizados;
- Os anticorpos IgY anti-recFljB extraídos de gemas de ovos de emas imunizadas foram capazes de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis in vitro*;
- Os anticorpos IgY anti-recFljB produzidos em ovos de ema e galinha foram capazes de reduzir a capacidade das cepas *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* PT4 aderirem e invadirem as células Caco-2 e HT-29, respectivamente.

15

## REFERÊNCIAS

- ADKINS, J. N., MOTTAZ, H. M., NORBECK, A. D., GUSTIN, J. K., RUE, J., CLAUSS, T. R. W., PURVINE, S. O., RODLAND, K. D., HEFFRON, F. AND SMITH, R. D. Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 1450-1461, 2006.
- ALLEN-VERCOE, E., WOODWARD, M. J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 771-780, 1999.
- ALMEIDA, C.M.K.; KANASHIRO, M.M.; RANGEL FILHO, F.B.; MATTA, M.R.F.; KIPNIS, T.L.; SILVA, W.D. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **The Veterinary Record**, v. 143, p. 579-584, 1998.
- AMARAL, J. A., DE FRANCO, M. T., ZAPATA-QUINTANILLA, L., CARBONARE, S. B. In vitro reactivity and growth inhibition of EPEC serotype O111 and STEC serotypes O111 and O157 by homologous and heterologous chicken egg yolk antibody. *Veterinary research communications*, v. 32, n. 4, p. 281-290, 2008.

ARAUJO, A.S. Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 57p. 2007.

- 5 ASTEN, A. J. A. M., DIJK, J. E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 251-259, 2005.

BEACHY, E. H. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **Journal of Infectious Diseases**, v.143, p. 325–345, 1981.

- 10 BERNARDO, A.R. Tecnologia IgY: Produção de anticorpos aviários para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com o uso ético dos animais de experimentação. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 60p., 2009.

- 15 BRAGA, C. J., MASSIS, L. M., ALENCAR, B. C., RODRIGUES, M. M., SBROGIO-ALMEIDA, M. E., FERREIRA, L. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 44-49, 2008.

BOLLEN, L.S., HAU J. Freund's complete adjuvant has a negative impact on egg laying frequency in immunised chickens. **In vivo**, v. 13, n. 1, p. 107-108, 1999.

- 20 CENCIC, A., LANGERHOLC, T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology—a review. **International journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S4-S14, 2010.

- 25 CIACCI-WOOLWINE, F., KUCERA, L. S. RICHARDSON, S. H. IYER, N. P. MIZEL. S. B. *Salmonella* activates tumor necrosis factor alpha production in a human promonocytic cell line via a released polypeptide. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4624–4633, 1997.

CIACCI-WOOLWINE, F., MCDERMOTT, P. F., MIZEL. S. B. Induction of cytokine synthesis by flagella from gram-negative bacteria may be dependent on the activation or differentiation state of human monocytes. **Infection and Immunity**, 67:5176–5185, 1999.

30

CIACCI-WOOLWINE, F., BLONFIELD, I. C., RICHARDSON, S. H., MIZEL, S. B. *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1127–1134, 1998.

- 35 CHALGHOUMI, R., THÉWIS, A., BECKERS, Y., MARCQ, C., PORTETELLE, D., SCHNEIDER, Y. J. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (igy) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in vitro. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 5, p. 593-604, 2009.

- CHNG, C. P., KITAO, A. Mechanical unfolding of bacterial flagellar filament protein by molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 6, p. 548-554, 2010.
- 5 CROMWELL, G. L. Why and how antibiotics are used in swine production. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 7-27, 2002.
- D'AOUST, J. Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 17-40, 1991
- 10 DE PAULA, V.S, DA SILVA, A.S., DE VASCONCELOS, G. A., IFF, E. T., SILVA, M. E., KAPPEL, L. A., CRUZ, P.B., PINTO, M. A. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 1, p. 102-106, 2011.
- 15 DEIGNAN T, ALWAN A, MALONE L, KELLY J, O'FARRELLY C. Hen egg yolk prevents bacterial adherence: a novel function for a familiar food. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 158-161, 2001.
- DIRAVIYAM, T., ZHAO, B., WANG, Y., SCHADE, R., MICHAEL, A., ZHANG, X. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: A systematic review and meta-analysis, **PLoS One**, v.9, n.5, p. 1-14, 9:e97716, 2014.
- 20 EAVES-PYLES, T., MURTHY, K., LIAUDET, L., VIRA'G, L., ROSS, G., SORIANO, F. G., SZABO, C., SALZMAN, A. L. Flagellin, a novel mediator of *Salmonella* induced epithelial activation of systemic inflammation: IκBα degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1248–1260, 2001a.
- 25 EAVES-PYLES, T., WONG, H. R., ODOMS, K., PYLES, R. B. *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxy regions of the protein. **The Journal of Immunology**, v. 167, p.7009– 7016, 2001b.
- 30 ELHADAD, D., DESAI, P., RAHAV, G., MCCLELLAND, M., & GAL-MOR, O. Flagellin Is Required for Host Cell Invasion and Normal *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Expression by *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi A. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 9, p. 3355-3368, 2015.
- 35 EOM, J. S., KIM, J. S., IM JANG, J., KIM, H. G., BANG, I. S., PARK, Y. K. Effect of iacP mutation on flagellar phase variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain UK-1. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4332 – 4341, 2012.
- 40 ERHARD, M. H., VON QUISTORP, I., SCHRANNER, I., JÜNGLING, A., KASPERS, B., SCHMIDT, P., KÜHLMANN, R. Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M and A using monoclonal antibodies. **Poultry Science** , v. 71, p. 302-310, 1992.

FERNANDES, L.M.B.; SILVA, P.S.; RAMOS, I.; SALES, T.S.; HERVAL, E.F.G.; BATINGA, T.B.; MAIA, P.C.C.; CÉSAR, A.E.R.; JUNIOR, L.D.; MEYER, R.; FREIRE, S.M. Soro epidemiologia da doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados da Bahia e de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, 20 p. 135-140, 2010.

5

FERREIRA JÚNIOR, Á., SANTIAGO, F.M., SILVA, M.V., FERREIRA, F.B., MACEDO JUNIOR, A.G., MOTA, C.M., FARIA, M.S., SILVA FILHO, H.H., SILVA, D.A.O., CUNHA-JUNIOR, J.P., MINEO, J.R., MINEO, T.W.P. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40391, 2012.

10

GAGNON, M., ZIHLER, A., CHERVET, N., CHASSARD, C., LACROIX, C. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 3, p. 274-279, 2013.

15

GEWIRTZ, A. T., NAVAS, T.A., LYONS, S., GODOWSKI, P.J., MADARA J. L. Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 1882–1885, 2001a.

20

GIRARD, A., ROQUES, E., MASSIE, B., ARCHAMBAULT, D. Flagellin in fusion with human rotavirus structural proteins exerts an adjuvant effect when delivered with replicating but non-disseminating adenovectors through the intrarectal route. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 5, p. 394-407, 2014.

25

GIRARD F, BATISSON I, MARTINEZ G, BRETON C, HAREL J, AND FAIRBROTHER JM. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 340–350, 2006.

30

GREUNKE, K., BRAREN, I., ALPERS, I., BLANK, S., SODENKAMP, J., BREDEHORST, R., SPILLNER, E. Recombinant IgY for improvement of immunoglobulin-based analytical applications. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 14, p. 1237-1244, 2008.

GRIMONT P. A. D, WEILL, F. X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 9th ed. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France, 2007.**

35

GUIMARÃES, M. C. C., AMARAL, L. G., RANGEL, L. B. A., SILVA, I. V., MATTÁ, C. G. F., DE MATTÁ, M. F. R. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 5, p. 377-382, 2009.

40

GUTIERREZ, J.A., GUIRRIERO, V. J.R. Quantitation of Hsp 70 in tissues using a competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay. **Journal of Immunological Methods**, v.143, p. 81-88, 1990.

HAIKO, J., WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. **Biology**, v. 2, n. 4, p. 1242-1267, 2013.

5 HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, 1999.

HAO, J., ZHANG, C., LIANG, T., SONG, J., HOU, G. rFliC prolongs allograft survival in association with the activation of recipient Tregs in a TLR5-dependent manner. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, n. 2, p. 206-214, 2014.

10

HUET, G., KIM, I., DE BOLOS, C., LO-GUIDICE, J.M., MOREAU, O., HERMON, B., RICHET, C., DELANNOY, P., REAL, F.X. Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 1275–1285, 1995.

15 HUYEN, D. T., GIANG, L. Q., HAI, T. N. Expression of flagellin FliB derived from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Escherichia coli* BL21. **Tap Chi Sinh Hoc**, v. 36, n. 4, p. 506-514, 2014.

20 IBARRA, J. A., KNODLER, L. A., STURDEVANT, D. E., VIRTANEVA, K., CARMODY, A. B., FISCHER, E. R., PORCELLA, S. F., STEELE-MORTIMER, O. Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect Salmonella–host cell interactions in vitro. **Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 1120-1133, 2010.

JEPSON, Mark A.; CLARK, M. Ann. The role of M cells in *Salmonella* infection. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14, p. 1183-1190, 2001.

25 JUSTIZ VAILLANT, A.A., AKPAKA, P. E., MCFARLANE-ANDERSON, N., SMIKLE, M. P., BRIAN WISDOM, B. Purification of Immunoglobulin Y (IgY) from the Ostrich (*Struthio camelus*) by Staphylococcal Protein a (Spa) Affinity Chromatography. **Journal of Chromatography Separation Techniques**, v. 3, n. 3, p. 1-3, 2012.

30 KLIMENTZOU, P. PARAVATOU-PETSOTAS M, ZIKOS CH, BECK A, SKOPELITI M, CZARNECKI J, TSITSILONIS O, VOELTER W, LIVANIOU E, EVANGELATOS GP Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 183-193, 2006.

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

KUROKI, M., OHTA, M., IKEMORI, Y., ICATLO JR. F. C., KOBAYASHI, C., YOKOYAMA, H., Y. KODAMA, Y. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves . **Archives of Virology**, v. 142, p. 843-51, 1997.

- LEE, E. N., SUNWOO, H. H., MENNINEN, K., SIM, J. S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**. v. 81, p. 632–641, 2002.
- 5 LEENAARS, M. P.P.A, HENDRIKSEN, C.F.M., LEEUW, W. A, CARAT, F., DELAHAUT, P., FISCHER, R., HADER, M., HANLY, W. C., HARTINGER, J., HAU, J. , LINDBLAD, B. E., NICKLAS, W., OUTSCHOORN, I. M., STEWART-TULL, D.E.S. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 27, p. 79-102, 1999.
- 10 LESUFFLEUR, T., PORCHET, N., AUBERT, J.P., SWALLOW, D., GUM, J.R., KIM, Y.S., REAL, F.X., ZWEIBAUM, A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. **Journal of Cell Science**, v. 106, p. 771–783, 1993.
- 15 LEVESQUE, S., MARTINEZ, G., FAIRBROTHER, J. M. P. S. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost effective production of high levels of specific IgY. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 630-635, 2007.
- LIM, J. S., NA, H. S., LEE, H. C., CHOY, H. E., PARK, S. C., HAN, J. M., CHO, K. A. Caveolae-mediated entry of *Salmonella Typhimurium* in a human M-cell model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 4, p. 1322-1327, 2009.
- 20
- MARANHÃO, A. Q. Transformação bacteriana. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. de. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 211 p., 2003.
- 25 MASSIS, L. M. Imunogenicidade e potencial vacinal das flagelinas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. **Tese** (Doutorado em ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007
- MIZEL, S. B.; BATES, J. T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 10, p. 5677-5682, 2010.
- 30
- MONTAGNA, D.R., RIGO, V., RAMAYO, L.G., GOLDMAN, L.H., HUGUET, M.J., MACEIRA, N., JAR, A.M. Caracterización de las inmunoglobulinas del ñandú (*Rhea americana*). **InVet**, v. 15, n. 2, p. 93-102, 2014.
- 35 NAFFEA, N.M., SABBAH, M. A., RAGHAD AL-SUHAIL, R., MAHDAVI, A. H., ASGARY. S. Development of hen antihepatitis B antigen IgY-based conjugate for ELISA assay. **Advanced Biomedical Research**. 4:100., 2015.
- NEEMA, K., SHIM, W. B. The in vitro and in vivo efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1423-1431, 2012.

NEMPONT, C., CAYET, D., RUMBO, M., BOMPARD, C., VILLERET, V., & SIRARD, J. C. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2036-2043, 2008.

5

OLIVEIRA, B. H., SILVA, M. R., BRAGA, C. J. M., MASSIS, L. M., FERREIRA, L. C. S., SBROGIO-ALMEIDA, M. E. TAKAGI, M. Production of native flagellin from *Salmonella* Typhimurium in a bioreactor and purification by tangential ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 575-584, 2011.

10

PARSONS, B. N., WIGLEY, P., SIMPSON, H. L., WILLIAMS, J. M., HUMPHREY, S., SALISBURY, A. M., WATSON, A. J. M., FRY, S. C., O'BRIEN, D., L. ROBERTS, C., O'KENNEDY, N., KEITA, A.V., SO" DERHOLM, J. D., RHODES, J.M., CAMPBELL, B. J. Dietary supplementation with soluble plantain non-starch polysaccharides inhibits intestinal invasion of *Salmonella* Typhimurium in the chicken, e87658. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2014.

15

PEI, J., COLLISSON, E.W. Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 2, p. 153-160, 2005.

20

PINO, O., MARTIN, M., MICHALEK, S. M. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6763-6770, 2005.

25

PINTO, M., ROBINE-LÉON, S., APPAY, M.D., KEDINGER, M., TRIADOU, N., DUSSAULX, E., LACROIX, B., SIMON-ASSMANN, P., HAFFEN, K. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.

RAMOS, H. C., RUMBO, M., SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 509-517, 2004.

30

ROSENSHINE, I., RUSCHKOWSKI, S., FOUBISTER, V., FINLAY, B. B. *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells: role of induced host cell tyrosine protein phosphorylation. **Infection and Immunity**, v.62, p. 4969-4974, 1994.

35

ROSOL, H., STEINMEYER, C. L., MCCAULEY, L. K., I. MERRYMAN, J. I., JAMES R. WERKMEISTER, J. R., GRÖNE, A., WECKMANN, M. T., SWAYNE, D. E., CAPEN, C. C. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 321- 337. 1993.

ROSSEZ, Y., WOLFSON, E. B., HOLMES, A., GALLY, D. L., HOLDEN, N. J. Bacterial Flagella: Twist and Stick, or Dodge across the Kingdoms. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, 2015.

5 ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. **Biochimie**, v. 68, p. 1035–1040, 1986.

RUSS C.; CALLEGARO I.; LANZA B.; FERRONE S. Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 269-271, 1983.

10 SANTOS, F. N., BRUM, B. C., CRUZ, P. B., MOLINARO, C. M., SILVA, V. L., CHAVES, S. A. M. Production and Characterization of IgY against Canine IgG: Prospect of a New Tool for the Immunodiagnostic of Canine Diseases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 523-531, 2014.

15 SCHADE, R., CALZADO, E.G., SARMIENTO, R., CHACANA, P. A., PORANKIEWICZ-ASPLUND, J., TERZOLO, H. T. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 129-154, 2005.

SCHNIERING, A., SCHADE, R., HIEPE, T. Development of an IgY-based assay for the detection of ascaris-suum antigens. **Alternatives to Animal Experimentation**. 1996; 13 (5): 62-65.

20

SHAH, D. H., ZHOU, X., ADDWEBI, T., DAVIS, M. A., ORFE, L., CALL, D. R., GUARD, J., BESSER, T. E. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1428-1445, 2011.

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

30 SKOUNTZOU, I., DEL PILAR MARTIN, M., WANG, B., YE, L., KOUTSONANOS, D., WELDON, W., JACOB, J., COMPANS, R. W. *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4103-4112, 2010.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

35

SOARES, B. A., SÁGIO, S. A., PECONICK, A. P., BARRIOS, P.R., CHALFUN-JÚNIOR, A., COSTA, G. M., BARÇANTE, J. M. P., MARTINS, N. R. S. Seleção, caracterização e clonagem dos genes *fljB* e *groEL* agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune inato das aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.3, p. 217-223, 2014.

- SONG, M. S., KIM, C. J., CHO, W. I., SUNWOO, H. H. Growth inhibition of *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores using chicken immunoglobulin y. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 4, p. 511-520, 2009.
- 5 SUGITA-KONISHI, Y., OGAWA, M., ARAI, S., KUMAGAI, S., IGIMI, S., SHIMIZU, M. Blockade of *Salmonella* Enteritidis passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. **Microbiology and Immunology**, v. 44, n. 6, p. 473-479, 2000.
- 10 SUGITA-KONISHI, Y., SHIBATA, K., YUN, S. S., HARA-KUDO, Y., YAMAGUCHI, K., KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 886-888, 1996.
- SUNWOO, H. H., LEE, E. N., GUJRAL, N., SURESH, M. R. Growth inhibition of *Escherichia coli* 987P by neutralizing IgY antibodies. **Open Immunology Journal**, v. 3, p. 1-8, 2010.
- 15 SUNWOO, H. H., E. N. LEE, K. MENNINEN, M. R. SURESH, AND J. S. SIM. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**. v. 67, p. 1486–1494, 2002.
- 20 TAVARES, T. C.F., SOARES, P. M., NEVES, J. H. F. F., SOARES, M.M., JUNIOR, A. F., SOUZA, D. L. N., VERIDIANA M.R. ÁVILA, V. M. R., RIBEIRO, A. M. C. L. Production and purification of polyclonal anti-Leptospira immunoglobulin Y. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1097-1102, 2013.
- 25 TOBIAS, F. L., GARCIA, L. N. N., KANASHIRO, M. M., MEDINA-ACOSTA, E., BROM-DE-LUNA, J. G., ALMEIDA, C. M. C. D., AZEVEDO JUNIOR, R.R., LEMOS, M., VIEIRA-DA-MOTTA, O. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 544-551, 2012.
- 30 TOBIAS, F.L. Fonte de Imunoglobulina Igy em Avestruzes (*Struthio camelus*) Imunizados com Proteínas Recombinantes de Origem Bacteriana em Criações dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, RJ. 110p., 2011.
- 35 TULLY Jr, T. N. Infectious Diseases of Ratites. The Merck Veterinary Manual, Merial, EUA, 2014. Disponível em [http://www.merckvetmanual.com/mvm/exotic\\_and\\_laboratory\\_animals/ratites/infectious\\_diseases\\_of\\_ratites.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/exotic_and_laboratory_animals/ratites/infectious_diseases_of_ratites.html), acesso em 25/08/2015.
- TURNER, J. L., DRITZ, S. S., MINTON, J. E. Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. **The Professional Animal Scientist**, v. 17, n. 4, p. 217-226, 2001.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; MEDINA-ACOSTA, E.; ALMEIDA, C. M. C.; KIPNIS, T. L.; DIAS DA SILVA, W. Development of anti-*Staphylococcus aureus* enterotoxins antibodies in chickens and their purification from yolk. **Scandinavian Journal of Immunology**, Supplement B, v. 54, Suppl 1. p. 117, 2001.

- 5 WANG, X. Z., FAN, B., LIU, L. G., HU, X. Y., LI, R. Y., WEI, Y., DENG, X. L. L. In vitro inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 381-387, 2008.

- 10 WIEDEMANN V, KUHLMANN R, SCHMIDT P, ERHARDT W, LOSCH U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases, in vivo tenacity test in piglets with artificial jejunal fistula. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 37, p. 163-72, 1990.

- 15 WITKOWSKI, P. T., BOURQUAIN, D. R., HOHN, O., SCHADE, R., NITSCHKE, A. Gene gun-supported DNA immunization of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 341, n. 1-2, p. 146-153, 2009.

WIZEMANN, T. M., ADAMOU, J. E., LANGERMANN, S. Adhesins as targets for vaccine development. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.5, p. 395–403, 1999.

- 20 YONEKURA, K., MAKI-YONEKURA, S., NAMBA, K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 191-197, 2002.

XU, Y., LIA, X., JIN, L., ZHEN, Y., LU, Y., LI, S., YOU, J., WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 860-868, 2011.

25

ZWEIBAUM, A., LABURTHE, M., GRASSET, E., LOUVARD, D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Comprehensive Physiology*, **American Physiological Society**, p. 223-255, 2011.

30

35

5

## 6 - CAPÍTULO 2

10

### **INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA POTENCIALMENTE PATOGÊNICA DE *Rhea americana* DE CATIVEIRO**

15



## 5 6.1 INTRODUÇÃO

A ema (*Rhea americana*) é uma grande ave corredora com uma estreita relação filogenética com o avestruz (*Struthio camelus*), casuar (*Casuaris sp.*), emu (*Dromaius novaehollandiae*) e kiwi (*Australis apteryx*). A espécie é nativa da América do Sul e encontrada na natureza em muitas regiões do Brasil, apesar das ameaças de caça e destruição do seu habitat (PARIZZI *et al.*, 2007, SOARES, H. *et al.*, 2010; IUCN, 2012).

Há poucos estudos sobre o aspecto sanitário da criação de emas cativas. Não há informações sobre os microrganismos presentes nessas aves e se o contato com esses animais favorece a disseminação de agentes infecciosos em novos hospedeiros e no ambiente. Emas, tal como outros animais selvagens, possivelmente aumentam a dispersão de microrganismos na cadeia de transmissão de doenças, tanto para seres humanos como para outros animais (AZEVEDO *et al.*, 2010, SOARES, H. *et al.*, 2010). Bactérias e fungos da microbiota das emas também podem ser fonte de autocontaminação e, dependendo das condições físicas e imunológicas do animal, podem ocasionar patologias graves (BRILHANTE *et al.*, 2013).

O estudo da microbiota bacteriana de aves silvestres clinicamente saudáveis é um passo importante para a compreensão da epidemiologia das doenças bacterianas que podem afetar as suas populações e espécies semelhantes (DOBBIN *et al.*, 2005). A microbiota fecal de aves silvestres tem sido pouco estudada, com poucos trabalhos sobre a ocorrência de bactérias de importância em saúde

pública, particularmente no Brasil. Devido ao pouco conhecimento da microbiota cloacal de aves silvestres e do perfil de sensibilidade das bactérias isoladas e, ainda, a possibilidade dessas aves abrigarem patógenos para humanos e outros animais, o presente estudo objetivou identificar a presença de microrganismos potencialmente patogênicos para o homem e outros animais em emas (5 *Rhea americana*) criadas em um Zoológico, um criatório conservacionista e um criatório científico no sudeste do Brasil, além de investigar o perfil de resistência a antimicrobianos e a presença de genes de virulência e resistência.

10

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Local e coleta de amostras

15

No período compreendido entre os anos de 2012 e 2014, foram coletadas amostras de fezes e suabes cloacais e de orofaringe de 63 emas hígdas, de ambos os sexos e de diferentes idades, da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte-MG, de um criatório conservacionista em Cachoeiro do Itapemirim-ES e do criatório científico da UENF.

20

A coleta foi realizada utilizando-se suabes estéreis, contendo meio próprio para conservação (suabe meio *Cary Blair*), as amostras de fezes foram imediatamente colocadas em frascos estéreis, devidamente identificadas e transportadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Sanidade Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF para isolamento e identificação.

25

### 6.2.2 Isolamento e identificação bacteriana

#### 6.2.2.1 Gram-negativas

O cultivo e a identificação dos membros da família *Enterobacteriaceae* foram realizados seguindo metodologia descrita por Costa & Hofer (1972) e Brasil (2011). Os suabes foram semeados em placas com meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia, Índia) e as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após esse período, as colônias morfologicamente diferentes foram novamente semeadas em ágar EMB e incubadas a 37°C, por 24h com a finalidade de obter massa bacteriana pura e suficiente para a realização dos testes bioquímicos.

Com o intuito de otimizar o isolamento de *Salmonella* spp., após a semeadura do suabe em meio ágar EMB, o mesmo foi mergulhado em 2,0 mL de caldo Rappaport Vasiliadis (Oxoid, UK) e incubado em banho-maria a 42°C por 18-24h. Após esse período, o caldo foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* foi semeado em meio ágar Hecktoen (Himedia, Índia) e incubado a 37°C por 24h. Colônias obtidas foram novamente semeadas em ágar Hecktoen e incubadas a 37°C por 24h para a realização dos testes bioquímicos.

Na caracterização bioquímica foram avaliadas as seguintes características: fermentação de carboidratos (glicose, sacarose, e lactose) com ou sem produção de gás, produção de indol, sulfato de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), urease, ácidos fortes (lático, acético e fórmico) e acetoína, utilização de citrato, capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina e presença de motilidade.

A fermentação de açúcares e produção de H<sub>2</sub>S foi verificada em meio ágar TSI (Himedia, Índia) a partir da mudança da cor do meio para amarelo e presença de precipitado negro, respectivamente. Para avaliar a produção de indol e a mobilidade foi utilizado o meio ágar SIM (Himedia, Índia). A mobilidade foi evidenciada através da presença de turvação do meio e a produção de Indol através da mudança de cor da superfície do meio para rosa após a adição de duas gotas do reagente de Kovacs (Laborclin, Brasil).

As produções de ácidos fortes e acetoína, a partir da fermentação da glicose, foram avaliadas nas provas do Vermelho de Metila (VM) e de Voges-Proskauer (VP), respectivamente. Para cada prova, uma amostra da colônia foi inoculada em 2,0 ml de caldo BHI (Himedia, Índia). A mudança de cor para vermelho da suspensão, na adição de 1,0 mL do reagente vermelho de metila indica a presença de ácidos fortes. Por outro lado, a produção de acetoína é verificada pela presença de um halo vermelho na superfície após adição de 0,2mL de hidróxido de potássio 40% e 0,6mL de α-naftol 5%.

A utilização do citrato como fonte de carbono foi avaliada utilizando o meio ágar citrato (Difco, EUA). A mudança de cor do meio para azul após o período de incubação indica positividade. A produção da enzima urease foi verificada através da inoculação de uma amostra da colônia em caldo ureia (INLAB, Brasil). A presença da degradação da ureia a amônia é evidenciada a partir da mudança de cor do meio para rosa.

A capacidade de descarboxilação da lisina e da ornitina foi verificada a partir da inoculação da amostra da colônia em caldo descarboxilase (Difco, EUA) com 1% de D-lisina e D-ornitina (INLAB, Brasil). A utilização desses aminoácidos foi indicada pela mudança da coloração do meio para roxo. As leituras dos resultados de todas as provas bioquímicas descritas acima foram feitas após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, por 48h dos respectivos meios inoculados.

Os cocobacilos Gram-negativos, catalase e oxidase positivos, citrato, ureia, malonato e lactose negativos, suspeitos de serem *Bordetella*, foram cultivados em meio *Smith-Baskerville*, usado como meio indicador para *Bordetella*, e incubado em estufa bacteriológica a 37° e após 48hs foi visualizado o meio azulado.

#### 6.2.2.2 Microrganismos Gram-positivos

Os suabes foram pré-enriquecidos em 2,0 mL de caldo BHI (Himedia, Índia) com 7,5% de NaCl e incubados em aerobiose a 37°C por 24h. Após centrifugação (4.000 rpm por 10 min), o *pellet* foi cultivado em meio ágar manitol salgado (Himedia, Índia) em aerobiose a 37°C por 24-48h. Para purificar as colônias utilizou-se ágar Nutriente (Himedia, Índia), em seguida, o gênero bacteriano foi determinado com base na morfologia da colônia, coloração de Gram, teste da catalase e teste da oxidase. Para a observação do padrão de hemólise, as colônias selecionadas eram recultivadas em ágar sangue base (Himedia, Índia) com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado em aerobiose a 37°C por 24h.

A identificação presuntiva dos gêneros foi feita através da realização de provas bioquímicas previamente descritas (QUINN *et al.*, 1994) onde foram avaliadas as seguintes características: fermentação de carboidratos (manitol, maltose e ribose) e produção de urease, acetoina, Dnase e coagulase.

#### 6.2.2.3 Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos

Nesta etapa as amostras foram caracterizadas de acordo com o perfil de sensibilidade a antimicrobianos. O teste foi realizado de acordo com a técnica de Difusão Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966) para a pesquisa de sensibilidade e resistência a fármacos, segundo as especificações do CLSI

(*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012). As amostras foram inoculadas em solução salina (0,85%) com concentração equivalente à densidade óptica a 0,5 de acordo com a escala de McFarland ( $10^8$  bactérias/mL) que foi padronizada em densitômetro (Densimat, Biomerieux, França).

Neste teste, o inóculo foi distribuído uniformemente em placas de Petri de 150 mm de diâmetro em ágar Müller-Hinton. Com o auxílio de uma pinça, os discos de antibióticos foram dispostos sobre o ágar, distantes aproximadamente três centímetros um do outro. Para as bactérias Gram-negativas foram testados os seguintes antibióticos: tetraciclina (TET, 30µg), cloranfenicol (CLO, 30µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 20/10µg), gentamicina (GEN, 10µg), ceftiofina (CFO, 30µg), tobramicina (TOB, 10µg), ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (CFL, 30µg), enrofloxacina (ENO 5µg), ciprofloxacino (CIP, 5µg) e sulfametaxazol/ trimetoprim (SXT, 25µg). Para as isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp., além dos citados acima, também foi testada a suscetibilidade a mais seis antibióticos: amoxicilina (AMO, 10 mg), aztreonam (ATM, 30 µg), cefalexina (CFX – 30 µg), cefazolina (CFZ 30 µg), cefepime (CPM 30µg), cefotaxima (CTX,30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg) e ceftriaxona (CRO 30 µg). Para as bactérias Gram-positivas o teste de sensibilidade foi realizado frente à amoxicilina (AMO, 10 mg), clindamicina (CLI, 2mg), cefalotina (CFL, 30mg), penicilina G (PEN, 10 UI), oxacilina (OXA, 1 mg), tetraciclina (TET,30mg), ampicilina (AMP, 10mg), eritromicina (ERI, 15mg), sulfazotrim (SUL, 25 mg), gentamicina (GEN, 10mg), ceftiofina (CFO, 30mg) e vancomicina (VAN, 30mg).

Apesar do disco de oxacilina não ser mais recomendado para previsão da resistência à oxacilina desde 2009, ele foi incluído neste estudo com o objetivo de comparar o seu desempenho com o disco de ceftiofina. As placas foram então incubadas a 37°C/18h, e a leitura do teste realizada medindo-se o halo formado, em milímetros, pelo não crescimento da bactéria em torno do disco de antibiótico, determinando assim o perfil de resistência completa, resistência intermediária e suscetibilidade da bactéria frente ao fármaco testado.

25

#### 6.2.2.4 Investigação molecular

A investigação dos genes de virulência das cepas de *E. coli* (n=86) foi realizada por PCR convencional (*bfpA*, *eae*, *stx*) e de virulência e resistência de *Staphylococcus* sp. por PCR convencional (*mecA*) e multiplex (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*). As sequências dos oligonucleotídeos específicos e os tamanhos esperados dos respectivos produtos de amplificação utilizados para essa etapa estão listados na tabela 1.

30

TABELA 1: Sequência dos oligonucleotídeos de genes específicos de *E. coli* e *Staphylococcus* spp. utilizados nesse estudo.

GENE	DESCRIÇÃO	INICIADORES 5' – 3'	TAMANHO DO PRODUTO DE PCR (pb)	FONTE
<i>bfpA</i>	Fímbria tipo IV	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	Aranda <i>et al.</i> , 2007
<i>eae</i>	Intimina	TACTGAGATTAAGGCTGATAA GATATCGAAGCCATTTGCTGG	453	Este estudo (GenBank - M8154.1)
<i>stx</i>	Shiga Toxina	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	518	Kobayash <i>et al.</i> , 2001
<i>mecA</i>	Resistência a metilina	ACTGCTATCCACCCTCAAAC CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000
<i>sea</i>	Enterotoxina A	GGTTATCAATGTGCGGGTGG CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000
<i>seb</i>	Enterotoxina B	GTATGGTGGTGAAGTACTGAGC CCAATAGTGACGAGTTAGG	164	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000
<i>sec</i>	Enterotoxina C	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	451	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000
<i>sed</i>	Enterotoxina D	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC	278	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000

#### 5 6.2.2.4.1 Extração e amplificação do DNA de *E.coli*

O DNA bacteriano foi extraído por lise térmica (100°C/10 minutos) de uma colônia isolada em ágar LB cultivada em estufa bacteriológica a 37° por 24 horas e suspensa em 50 µL de água ultrapura estéril. A amplificação do DNA foi realizada em solução com volume final de 50µL por amostra, contendo 10µL de DNA molde, 25 µL de PCR Mix (Thermo Scientific PCR Master Mix®), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (Tabela1) e 13 µL de água ultrapura que compõe o Kit.

Para a análise dos genes de virulência *eae* (453pb) e *bfpA* (326pb), a mistura foi submetida em um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler® (Applied Biosystem, EUA), as condições de amplificação foram 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos seguido de 72°C por sete minutos para o alongamento final das fitas. Para o gene de virulência *stx* (518 pb), as condições da amplificação foram: 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 1,5 minutos e 72°C por 1,5 minutos seguido de 72°C por sete minutos para o extensão final das fitas. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (0,5X), a 100 v, durante aproximadamente 40 minutos, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta em Sistema de Visualização e Processamento de Imagens MiniBispPro® (Bio América Inc., EUA) utilizado um transiluminador UV (DyNA Light, Labnet, EUA) com digitalizador acoplado (Gel Logic 112, Carestream, EUA) para documentação por imagem, usando marcador de peso molecular de 100pb (Promega, Madison, WI, EUA) (Ladder 100PB, Ludwig Biotec, Brasil). O controle positivo usado para os genes *eae* e *bfpA* foi a cepa de *E. coli* enteropatogênica E2348/69, e para o gene *stx* foi a cepa *E. coli* enterohemorrágica EDL931, gentilmente cedidas pela Dra. Katia R.S. Aranda, da UNESP.

#### 6.2.2.4.2 Extração e amplificação do DNA de *Staphylococcus spp*

Para os genes de enterotoxinas de *Staphylococcus sp.* (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e de resistência a metilicina (*mecA*) seguiu-se o protocolo de PCR multiplex publicado por Mehrotra *et al.*, 2000.

Os isolados de *Staphylococcus spp* foram crescidos em caldo BHI, por 18 horas a 37°C. O cultivo foi centrifugado e o DNA cromossômico foi extraído utilizando o *Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit*® (EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação do DNA foi realizada em solução com volume final de 50µL por amostra, contendo 1µL de DNA molde (100 – 500ng/µL), 25 µL de PCR Mix (*Thermo Scientific PCR Master Mix*®), 1 ou 2µL de cada oligonucleotídeo (20 pmol para os oligonucleotídeos *sea*, *seb* e *sec* e 40 pmol para *sed*) (Tabela1) e 14 µL de água ultrapura que compõe o Kit. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 2 minutos,

anelamento a 57°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto) finalizando com extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de Agarose 1% contendo brometo de etídeo. Os géis foram visualizados e a imagem capturada como descrito acima. Como controle positivo para o gene *mecA* foi utilizada a cepa ATCC 33591 para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e para os genes das enterotoxinas estafilocócias foram utilizadas as cepas ATCC 13565 (*sea*), 14458 (*seb*), 19095 (*sec*) e 23235 (*sed*) do acervo do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

10

15

### 6.3 RESULTADOS

Foram isolados 203 microrganismos no total. Destes, 65% (132) eram Gram-negativos de 11 gêneros diferentes, sendo a maioria da família *Enterobacteriaceae*, obtida (quem foi obtida? A família *Enterobacteriaceae*? Ou os microrganismos? É preciso saber para ajustar a concordância) de 74 amostras de suabes de cloaca, orofaringe e de fezes coletadas de 63 emas de cativeiro clinicamente saudáveis provenientes de três criatórios diferentes, entre 2012 e 2014. Os microrganismos Gram-negativos isolados e sua frequência são apresentados na tabela 2. Observa-se que o microrganismo mais frequente foi *E. coli* seguido por *Klebsiella* spp. e *B. avium*. Não foi identificada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras coletadas. Das *E. coli* aqui isoladas, 11,6% foram caracterizadas como enteropatogênicas - EPEC (presença do gene *eae* e ausência dos genes *bfpA* e *stx*) - Figura 26.

TABELA 2: Frequência de microrganismos Gram- negativos isolados de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

Microrganismo	Família	Frequência % (n)
<i>E. coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	62,1 (86)
<i>E. fergusonii</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,75 (01)

<i>Edwardsiella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,5 (02)
<i>Yersinia</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,75 (01)
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	8,3 (11)
<i>Francisella</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,75 (01)
<i>P. mirabilis</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	4,5 (06)
<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,75 (01)
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	10,6 (14)
<i>B. avium</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	4,5 (06)
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonadaceae</i>	1,5 (02)
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Moraxellaceae</i>	0,75 (01)

n= número de isolados

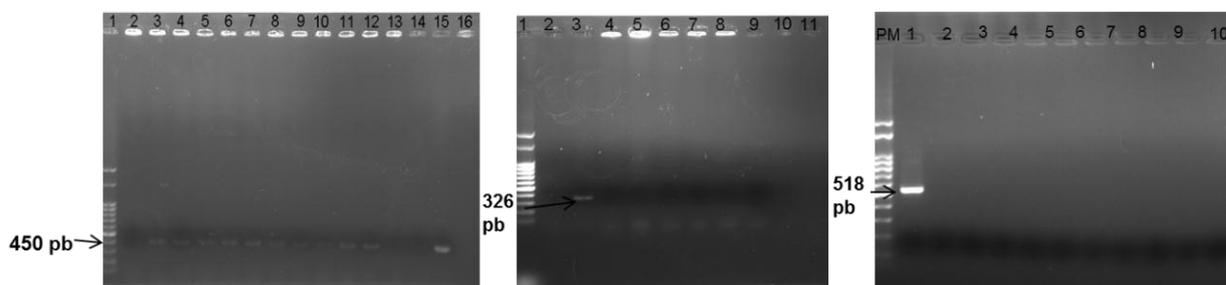


FIGURA 26: Gel de agarose 1% resultante da eletroforese da PCR para genes *eae* (A), *bfpA* (B) e *stx* (C) das cepas de *E. coli* isoladas de *Rhea americana*. A- gene *eae*: 1: marcador de peso molecular (100 pb. Ludwig®); 2,13 e 14: amostras negativas; 3-12: amostras positivas; 15: Controle Positivo- 453 pb e 16: controle negativo. B- gene *bfpA*: 1: marcador de peso molecular (100 pb. Ludwig®); 2: Controle negativo; 3: controle positivo – 326 pb; 4-11: amostras negativas. C- gene *stx*: PM: marcador de peso molecular (100 pb. Ludwig®); 1: Controle positivo; 2: controle negativo – 518 pb; 3-10: amostras negativas. LSA/UENF, 2014.

Os resultados referentes ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos estão apresentados no quadro 4. As espécies *Citrobacter* spp, *E. fergusonii* spp, *Edwardsiella* spp, *Proteus mirabilis* e *Yersinia* spp. demonstraram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Todas as bactérias isoladas foram sensíveis à tetraciclina, amoxicilina/ ácido clavulânico e sulfametaxazol/ trimetoprim. Os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. apresentaram sensibilidade à ceftriaxona, cefepime e aztreonan. Os isolados de *Bordetella avium* foram resistentes aos fármacos cefoxitina, enrofloxacino, ampicilina,

cloranfenicol. Nenhuma das aves apresentava sinais da infecção. Os menores percentuais de resistência foram observados frente à cefotaxima, ciprofloxacina e gentamicina.

QUADRO 4: Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas isoladas de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

MO \ ATB	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=1)		<i>Bordetella</i> spp. (n=6)		<i>Enterobacter</i> spp. (n=11)		<i>E. coli</i> (n=86)		<i>Francisella</i> spp. (n=1)		<i>Klebsiella</i> spp. (n=14)		<i>Pseudomonas</i> spp. (n=2)	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
Amoxicilina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	2	18	NT	NT	-	-	NT	NT
Ampicilina	-	-	2	1	-	-	3	-	-	-	-	14	-	-
Cefalexina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	2	1	NT	NT	-	-	NT	NT
Cefalotina	1	-	-	-	-	4	21	5	-	1	3	1	-	2
Cefazolina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	33	-	NT	NT	2	-	NT	NT
Cefoxitina	1	-	-	4	-	6	-	-	-	1	-	-	-	2
Cefotaxima	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	1	NT	NT	-	-	NT	NT
Ciprofloxacino	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Clorfenicol	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacino	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramicina	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5 ATB= antibiótico; MO = microrganismo; n= número de isolados; NT= não testado.

Foram 71 microrganismos Gram-positivos de cinco gêneros diferentes, sendo quatro deles potencialmente patogênicos, isolados das amostras fecais, cloacais e de orofaringe das emas. Na Tabela 3 é possível observar que dentre os Gram-positivos o grupo *Staphylococcus* spp. foi o mais isolado. Cabe ressaltar que todos os isolados eram coagulase negativa (SCN).

TABELA 3: Microrganismos Gram-positivos isolados de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

Bactérias Gram-positivas	Número de isolados (total = 71)
<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)	36
<i>Enterococcus</i> spp.	07
<i>Streptococcus</i> spp.	01
<i>Corynebacterium</i> spp.	02
<i>Micrococcus</i> spp.	25

O quadro 5 apresenta os resultados referentes ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos provenientes de amostras de emas. Os resultados apontam para uma elevada resistência à penicilina (66,7% - 24/36) para os isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa. Tanto para os antibióticos gentamicina quanto para eritromicina, as cepas SCN apresentaram 25% de resistência (9/36); para os antibióticos sulfazotrim e tetraciclina, a resistência foi 17 e 14%, respectivamente. Resistência intermédia para SCN foi observada frente aos antibióticos penicilina e tetraciclina. Identificou-se 14% (1/7) de *Enterococcus* spp. resistentes à clindamicina e sulfazotrim e com resistência intermediária à eritromicina e gentamicina. Tanto SCN e *Enterococcus* foram sensíveis à amoxicilina, cefalotina, oxacilina, ampicilina, cefoxitina e vancomicina. Os isolados *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Micrococcus* spp. foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

QUADRO 5: Perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* e *Enterococcus* sp. isoladas de *Rhea americana* de cativeiro, em três criatórios da região sudeste brasileiro, no período de 2012-2014.

ATB \ MO	<i>Enterococcus</i> sp. (n=7)		<i>Staphylococcus</i> sp. - SCN (n=36)	
	I	R	I	R
Clindamicina	-	1	-	-
Eritromicina	1	-	-	9
Gentamicina	1	-	-	9
Penicilina	-	-	1	24
Sulfazotrim	-	1	-	6
Tetraciclina	-	-	4	5

ATB= antibiótico; MO = Microrganismo; n= número de isolados

Entre as amostras SCN, 16 isolados (44,4%) eram portadores do gene *mecA* (Figura 27), 24 isolados (66,7%) carregavam o gene para a enterotoxina A (*sea*), e 3 amostras o gene para a enterotoxina B (*seb*). Em nenhum dos isolados amplificou-se os genes *sec* e *sed* (Figura 28).

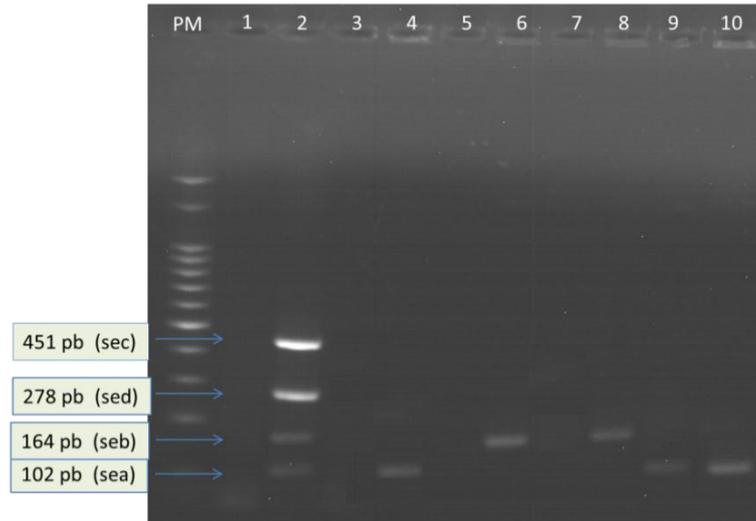


FIGURA 27. Gel de agarose 1,5% resultante da eletroforese da PCR Multiplex para genes de enterotoxinas de *Staphylococcus coagulase negativa*. PM: marcador de peso molecular (100 pb. Ludwig®); 1: controle negativo; 2: controle positivo; 4, 6, 8, 9 e 10: amostras produtoras de enterotoxinas; 3, 5, 7: amostras não produtoras de enterotoxinas.

5

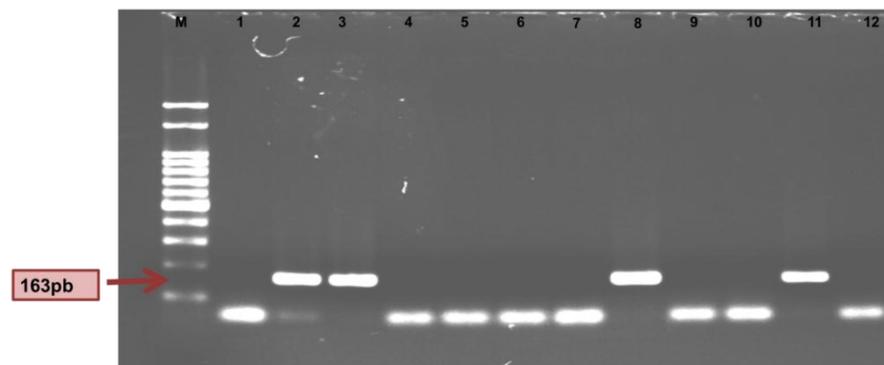


FIGURA 28: Gel de agarose 1,5% resultante da eletroforese de produtos de amplificação de PCR para genes de *S. aureus* resistentes a Meticilina: *mecA*. M :marcador de peso molecular (100 pb. Ludwig®); 1: controle negativo; 2: controle positivo; 3, 8, e 11: amostras positivas para o gene *mecA*. 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 12: amostras negativas.

10

15

## 6.4 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal das aves é composta por inúmeras espécies de bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico (FURLAN *et al.*, 2004). Nas aves, a fonte primária de infecção ocorre principalmente pela rota feco-oral, ou seja, através de alimentos, água, ovos contaminados ou pelo hábito de coprofagia (HAGAN & BRUNER, 1988). A presença da microbiota intestinal normal, em equilíbrio, é tão necessária quanto benéfica para o bem-estar do animal. Estima-se que apenas 10% dessa microbiota são constituídos de bactérias consideradas potencialmente nocivas ao hospedeiro, entre elas, a *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. Em aves, outros gêneros bacterianos também foram citados por Furlan *et al.*, (2004) e Palermo-Neto *et al.*, (2005), tais como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Veillonella* e *Streptococcus*. Mesmo em liberdade, aves podem hospedar microrganismos com potencial para causar doenças na própria espécie, em outros animais e em humanos. No entanto, em geral, observa-se um equilíbrio entre o microrganismo e o hospedeiro como parte de um processo de coevolução e que também atua sobre o controle populacional (MEVILLE *et al.*, 2014). Neste estudo destacamos a microbiota potencialmente patogênica das emas cativas, independente do sistema de criação: zoológico, criatório conservacionista ou científico.

Diversas espécies de enterobactérias causam doenças que cursam com diarreia. As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis por uma grande parcela das infecções em humanos e animais, sendo mais frequentes as causadas por *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. (HOLT *et al.*, 1994), esses microrganismos foram isolados das emas deste estudo. Um agravante é o fato de que uma boa parte desses microrganismos carrega genes que conferem resistência a antibióticos, tornando-os potencialmente patogênicos para seus hospedeiros.

A bactéria Gram-negativa mais frequente foi *E. coli* (62,1%) e, dessas, um total de 10 isolados (11,6%) foram positivos para o gene *eae*, e todas foram negativas para o genes *bfpA* e *stx*, sugerindo assim que essas cepas são EPEC - *E.coli* enteropatogênica atípica (AFSET *et al.* 2004).

Diversos estudos foram realizados em diferentes espécies de aves domésticas e silvestres, com o objetivo de identificar a circulação de genes de virulência associados à *E. coli* enteropatogênicas em aves. Os resultados desta investigação se aproximam dos descritos por diversos autores em diferentes aves (CHANDRAN & MAZUMDER, 2014; GHOLAMI-AHANGARAN & ZIA-JAHROMI, 2014; KNOBL *et al.*, 2011; SACRISTÁN *et al.*, 2014). As amostras de *E. coli* que amplificaram o gene *eae*

foram provenientes das emas do criatório Científico da Universidade Estadual do Norte Fluminense, alojadas em piquetes em que circulam animais como carneiros e outras ratitas, além de serem frequentados rotineiramente por estudantes, professores e funcionários do setor. Krause *et al.* (2005) afirmaram que os animais domésticos representam um importante reservatório natural de cepas de *E. coli* enteropatogênicas.

A resistência a fármacos antimicrobianos é um problema crescente, e o aparecimento de bactérias resistentes em animais selvagens é um assunto que tem sido discutido por vários autores, na medida em que a sua emergência é uma inferência à contaminação ambiental (GUENTHER *et al.*, 2010). Ao serem eliminadas no ambiente, as bactérias multirresistentes a antimicrobianos podem se multiplicar e infectar diferentes hospedeiros, disseminando a resistência antimicrobiana entre as bactérias (MEVILLE *et al.* 2014).

São poucos os relatos sobre a microbiota de emas, Pereira *et al.* (2012) isolaram diferentes espécies de *Salmonella* no fígado, conteúdo cecal e por suabes cloacal de emas híginas abatidas no Rio Grande do Sul, e destas, 94,2% dos animais eram portadores da bactéria. A presença de espécies de *Staphylococcus* spp. em emas foi identificada por Gomes *et al.* (2013) em uma ema de cativeiro em Palmas, Tocantins. *Escherichia coli* resistente a betalactâmico foi isolada de uma ema de zoológico por Klimes *et al.* (2013).

Em outras espécies de aves cativas ou de vida livre, o estudo da microbiota potencialmente patogênica tem sido vastamente realizado. Melville *et al.* (2014) estudaram a microbiota de passeriformes em São Paulo e encontraram microrganismos com potencial patogênico semelhante ao encontrado nesta pesquisa, foi identificada a presença de microrganismos em 158 (62,5%) das 253 amostras coletadas (*Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus* spp. e *Citrobacter* spp). Em avestruzes híginas, De Almeida *et al.* (2005) isolaram da orofaringe bactérias Gram-negativas (*E.coli* e *Proteus* spp.), Gram-positivas (*Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp.) e leveduras (*C. albicans* e *Candida* spp). Na mesma investigação, as fezes dessas ratitas foram avaliadas e a microbiota foi composta por bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Proteus* spp.), Gram positivas (*Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.) e leveduras (*C. albicans* e *Candida* spp.). Melville *et al.* (2004) também pesquisaram a microbiota de avestruzes e isolaram da cloaca *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* coagulase-negativa, *P. aeruginosa*, *Rhodotorula* spp. Das amostras da orofaringe foram isolados *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-negativa, *K. pneumoniae*, *Rhodotorula* spp e *Cryptococcus* spp. Vieira-da-Motta *et al.* (2008) encontraram em culturas de diferentes amostras

colhidas de avestruzes *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans* e *Pseudomonas mendocina*. Nesse trabalho, os autores sugerem um caso de septicemia em um dos animais com crescimento exclusivo de *K. pneumoniae* isolada de amostras de intestino delgado, pulmões e fígado.

5           Dentre as bactérias Gram-negativas aqui observadas, cabe destacar que 4,5% delas foram identificadas como da espécie *B. avium* com caráter de multirresistência (cefotaxima, enrofloxacino, ampicilina, e cloranfenicol). Essa bactéria foi isolada das emas do criatório conservacionista do Espírito Santo, que compartilhavam o ambiente com uma grande diversidade de outros animais cativos e até mesmo com aves de vida livre, podendo ser essas as fontes de contaminação. Nenhuma das aves  
10           apresentava sinais da infecção por esse agente. Esse é o primeiro relato dessa bactéria isolada de emas saudáveis. A bactéria *B. avium* é o agente etiológico da bordetelose aviária, uma doença altamente contagiosa das vias respiratórias superiores, principalmente de aves jovens, mas que também já foi isolada de pacientes com fibrose cística (HARRINGTON *et al.*, 2009). É um cobicilo pleomórfico, Gram-negativo, aeróbio e não fermentador. Além disso, produz hemoaglutinação dos eritrócitos de ave,  
15           que é uma característica que demonstra sua afinidade para aderir-se aos epitélios respiratórios (RAFFEL *et al.*, 2002). Sua prevalência entre perus domesticados é bem conhecida, mas informações sobre a prevalência dessa bactéria em outras aves é limitado. Estudos têm demonstrado que as aves infectadas não necessariamente apresentam sinais da enfermidade. Embora a doença não seja letal, as aves portadoras são suscetíveis de padecer infecções secundárias, como aquela produzida por  
20           bactérias oportunistas como *E. coli* (GRESPLAN, *et al.*, 2012). Essa bactéria também está frequentemente associada a outras enfermidades respiratórias tais como Doença de Newcastle ou *Mycoplasma* spp. (BRITTINGHEM *et al.* 1985). As manifestações clínicas da doença podem ser confundidas com as de outros agentes que causam afecções das vias respiratórias, motivo pelo qual é indispensável o diagnóstico diferencial de *B. avium*.

25           As emas dessa pesquisa eram portadoras de bactérias Gram-positivas de importância zoonótica (*Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.). Esses agentes são associados a infecções aviárias (CASTELLANOS-SUÁREZ *et al.*, 2009; WALKER, 2012; CASTRO-SILVA *et al.*, 2011), porém neste estudo nenhuma ema apresentava sinal de doença. Esse é o primeiro relato da presença desses patógenos em *Rhea americana*. Destaca-se uma cepa de *Enterococcus* spp. isolada de uma ema fêmea adulta, do zoológico que apresentou multirresistência aos antibióticos Clindamicina, eritromicina, gentamicina e Sulfazotrim.  
30

*Micrococcus* spp. normalmente é considerado um microrganismo saprófito inofensivo e habita ou contamina a pele, mucosa e orofaringe. Eventualmente podem ser patógenos oportunistas para indivíduos imunocomprometidos (BANNERMAN *et al.* 2006).

*Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) são espécies de bactérias comensais e patógenos oportunistas que podem causar infecções em humanos e animais. (BANNERMAN *et al.*, 2006; OTTO, 2010). O perfil de resistência aos antibióticos encontrado para os isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa, observados neste estudo, apresenta alta incidência de resistência à penicilina, resultado ainda não encontrado em aves, mas já observado em outra espécie animais. Soares *et al.* (2008) isolaram SCN em conduto auditivo de cães com 87,5% de resistência à penicilina. Os isolados SCN provenientes das emas apresentaram 25% de resistência à gentamicina, esses resultados são superiores aos SCN isolados por Soares *et al.* (2008).

Todas as cepas SCN foram sensíveis à oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg) e ainda assim 44,4% dos isolados apresentaram o gene *mecA*. A detecção da resistência à oxacilina pela utilização de métodos fenotípicos apresenta problemas devido à expressão heterogênea do gene *mecA* (MARANAN *et al.*, 1997). De acordo com esses autores, em uma população bacteriana com resistência heterogênea, todas as células carregam os marcadores genéticos de resistência à meticilina, mas a resistência fenotípica só ocorre numa pequena fração da população. Essa investigação é a primeira a relatar alta incidência de SCN *mecA* positivos isolados de animais, e a primeira vez descrita em amostras obtidas de *Rhea americana*. Raramente há relato de SCN em aves doentes e alguns em aves saudáveis (KAWANO *et al.* 1996; HAN *et al.* 2013, SOUSA *et al.*, 2014). Sousa *et al.* (2014) identificaram a presença do gene *mecA* em SCN (*S. epidermididis*) resistente à penicilina em aves de rapina em Portugal. Doyle *et al.* (2012) ao revisarem resistência à meticilina em diferentes espécies de *Staphylococcus* relataram em isolamento anterior de SCN portadores do gene *mecA*.

Quanto à investigação de enterotoxinas, os dados aqui encontrados corroboram com outros estudos, nos quais o gene *sea* tem relacionado à toxina SEA como a principal envolvida nos surtos alimentares, sendo a mais frequente entre os *Staphylococcus* coagulase-negativa (CUNHA *et al.*, 2006).

As enterotoxinas de *S. aureus* são os principais responsáveis por intoxicações alimentares (LAMAITA *et al.*, 2005), além de representarem sérios riscos a indivíduos imunodeprimidos por suas propriedades superantigênicas (MEHROTRA *et al.*, 2000). Diversos estudos relatam a presença de algumas espécies de SCN produtoras de enterotoxinas (CUNHA *et al.*, 2007; MARIANO *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008; VERAS *et al.*, 2008). Embora *Staphylococcus* spp. esteja associada a inúmeras

doenças em animais, há pouca informação como agente de gastroenterites toxigênicas (VERAS *et al.*, 2008). O gene responsável pela expressão da enterotoxina estafilocócica B (SEB) foi identificado em 8,3% dos isolados SCN. A identificação dessa enterotoxina em surtos alimentares é menor que a SEA, porém não menos importante (PRADO *et al.*, 2015). A detecção de espécies de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico revela a disseminação dessa bactéria entre os animais de cativeiro por fontes ainda desconhecidas. O fato das aves aqui estudadas estarem em contato frequente com áreas de pastagem, seres humanos e outros animais infere-se uma contaminação cruzada entre o homem, os animais e o ambiente de SCN enterotoxigênicos e multirresistentes com potencial risco para a saúde de animais e homem.

10           A produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) pelas cepas *E. coli* e *Klebsiella* spp foi destacada em um artigo submetido a revista *Poultry Science*, e o manuscrito é detalhado ao final dessa sessão.

15

20

25

## 7 - ARTIGO

5

**Identification of bla<sub>CTM-X</sub>, bla<sub>SHV</sub>, and bla<sub>TEM</sub> genes in ESBL-positive  
*Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolated from Greater Rhea (*Rhea  
americana*) in Brazil**

10

Autores: Elisabete Sales Corrêa

Leonardo Willian da Silva Pinto

Carlos Jorge Logullo de Oliveira

15

Olney Vieira-da-Motta

20

Artigo submetido para publicação na Revista *Poultry Science*

**Identification of bla<sub>CTM-X</sub>, bla<sub>SHV</sub>, and bla<sub>TEM</sub> genes in ESBL-positive *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolated from Greater Rhea (*Rhea americana*) in Brazil.**

5 Elisabethete Sales Corrêa, Leonardo Willian da Silva Pinto, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, Olney Vieira-da-Motta

Running head: ESBL-*enterobacteriaceae* isolated from Greater Rhea in Brazil

**ABSTRACT**

10

While necessary, investigations on gram-negative ESBL-resistant bacteria from wild animals are scarce. In this work, samples of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. were isolated from Greater Rhea (*Rhea americana*) from one zoo, from an experimental facility and a conservatory breeding farm (CBF) from the southeastern region of Brazil. The resistance profile against 16 beta-lactamic drugs was established through the conventional biochemical test, and ESBL-producer strains through the presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by PCR. The antimicrobial resistance profile against beta-lactamic revealed that *E. coli* was more sensitive than *Klebsiella* spp. For *E. coli*, in descending order, cefazolin (38.34%), cefalotin (30.24%), and amoxicillin (23.26%) were the least active drugs, respectively. Meanwhile, for *Klebsiella* spp., there was a 100% resistance towards penicillin G, ampicillin, amoxicillin, and oxacillin, followed by cefalotin (28.57%), and cefazolin (14.29%). As expected, bacteria isolated from birds from zoos were more resistant than those from CFs. ESBL bacteria were confirmed by amplification of at least one of the investigated genes, in both species, and 100% of *Klebsiella* spp. strains were *bla*<sub>SHV</sub>-positive. The data indicate that Greater Rhea may spread ESBL-producing bacteria into the environment and help shed light on zoonotic potential for workers.

25 Keywords: enterobacteriaceae, antimicrobial resistance, zoonosis, Greater Rhea, preservation, wildlife, molecular profile.

## INTRODUCTION

Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) genes are located in plasmids and confer wide resistance to ESBL-positive bacteria by inactivation of the  $\beta$ -lactamic ring. Among ESBL-positive bacteria, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are the most commonly found (FREITAS *et al.*, 2003; PATERSON and BONONO, 2005). Unfortunately, however, ESBL-positive bacteria in wild captive animals is not well understood. Among Brazilian fauna, Rhea (*Rhea americana*) are big ratite group birds distributed throughout much of South America and Brazil. These birds are considered endangered animals (CITES, 2003; IUCN, 2012) because of hunting and/or environmental degradation (GIANNONI, 1996). These animals can also be reared in semi-intensive systems (GÓES *et al.*, 2010). The resistance phenomena among microorganisms worldwide is accelerating, as is knowledge related to the sensitivity profile of enterobacteriaceae-causing infections, including their resistance dissemination paths (WEINSTEIN, *et al.* 2005).  $\beta$ -Lactamase producer bacteria are among the most important clinical agents in human and veterinary medicine. The resistance of these agents towards  $\beta$ -lactamic drugs is increasing, including among animal strains (STOLKER and BRINKMAN, 2005; PITOUT and LAUPLAND, 2008).  $\beta$ -lactamase comprise a large group of enzymes able to hydrolyze the  $\beta$ -lactamic ring of penicillin, cephalosporin, and monobactamic drugs (LIVERMORE, 1995).

The CLSI (2012) recommends the use of the phenotypic test as a standard method for identifying ESBLs in the microbiology laboratory for all isolates of *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumonia*, and *E. coli*, no matter which infection site is involved.

$\beta$ -lactamic resistance usually depends on the expression of *bla* genes. Most ESBL is derived of TEM and SHV  $\beta$ -lactamases (BUSH, 1995; JACOBY, 1991). Type CTX-M  $\beta$ -lactamases are the most prevalent among ESBL TEM-negative and SHV-negative specimens (PEREZ, 2007).

Greater Rhea can be affected by several pathogenic bacteria and parasites causing various diseases (PEREIRA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2013). However, the literature does not offer extensive material on resistant bacteria and their role in disease and in the natural environment frequented by these animals. This is the first data in Brazil carried out with ESBL-positive *E. coli* and *Klebsiella* spp. and investigating *bla*TEM, *bla*SHV, and *bla*TEM genes isolated from Greater Rhea (*Rhea americana*) living in three different systems, i.e., free-living, reared in captivity in zoos, and raised in a CBF.

## METHERIALS AND METHODS

### **Sampling Area**

Samples were obtained from two facilities, one for scientific and research purposes at Campos dos Goytacazes municipality, a facility of State University of Norte Fluminense in the northeastern area of Rio de Janeiro State (Latitude: -21.7545, Longitude: -41.3244; 21° 45' 16" Sul, 41° 19' 28" West), and another from the CBF Itapemirim Camilo Cola Ecological Park, at Cachoeiro do Itapemirim municipality in the south of Espírito Santo State (-20.8494 , Longitude: -41.1132; 20° 50' 58" Sul, 41° 6' 48" West), and from zoo Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (FZB-BH), at the capital of Minas Gerais State (-19.8157, Longitude: -43.9542; 19° 48' 57" Sul, 43° 57' 15" West;), all of them located at southeastern region of Brazil (figure 1).

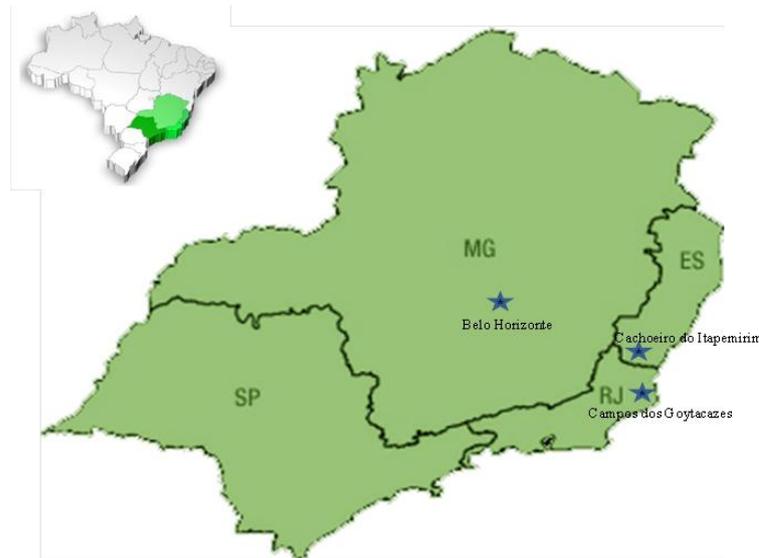


Figure 1: Map of Brazil showing locations and coordinate of municipalities from Brazilian Southern Region. Sampling area represented by a star. Zoo at Belo Horizonte capital of Minas Gerais State: Latitude: -19.8157, Longitude: -43.9542; 19° 48' 57" Sul, 43° 57' 15" West; Conservationary breeding Farm at Cachoeiro do Itapemirim municipality, Espírito Santo State: Latitude: -20.8494 , Longitude: -41.1132; 20° 50' 58" Sul, 41° 6' 48" West; Experimental facility at State University of Norte Fluminense -UENF in Campos dos Goytacazes, northern region of Rio de Janeiro State: Latitude: -21.7545, Longitude: -41.3244; 21° 45' 16" Sul, 41° 19' 28" West.

### **Sampling Procedure**

A total of 74 samples obtained with swabs from cloaca, oropharynx, and from feces were collected during 2012-2014 from 63 clinically healthy Greater Rheas of both sexes and different stages of development (age).

## **Bacterial Culture**

Samples were enriched in BHI broth for 24 h at 37°C. MacConkey agar and EMB agar were used to select, isolate, and obtain pure colonies after incubation at 37° C for 24 h. Conventional biochemistry tests, such as fermentation of glucose, sucrose, and lactose; the gas production test using indole, hydrogen sulfate, urease, lactic acid, acetic acid, and formic acid; the acetoin production test; and the citrate test, based on the decarboxylation of lysine and threonine amino acids were used to identify *E. coli* and *Klebsiella* spp. and finally to select pure colonies for subsequent tests.

## **Phenotypic detection of ESBL-positive *E. coli* and *Klebsiella* spp. strains**

10

To identify *E. coli* and *Klebsiella* spp. ESBL-producing strains the disk diffusion method (Kirby-Bauer) was used according to the procedures recommended by CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2012). For the screening of ESBL-positive agents four antimicrobial disks (Laborclin, Brasil), containing aztreonam (ATM, 30µg), cefotaxime (CTX, 30µg), ceftazidime (CAZ, 30µg), and ceftriaxone (CRO 30µg) were used. After 18 hours of incubation at 37°C the inhibition zones were measured with a digital caliper. All isolates with inhibition zones smaller or equal to the cut points of at least one of the antibiotics were considered potential ESBL-producing: aztreonam and cefotaxime ( $\leq 27$ mm), ceftazidime ( $\leq 22$ mm), and ceftriaxone ( $\leq 25$ mm). In addition, all probable ESBL-positive strains were submitted to a confirmatory test. They were dispensed on Müller-Hinton agar, and disks containing third generation cephalosporins in the presence of amoxicillin-clavulanic acid disks. Inhibition zones were measured after 18 hours of incubation at 37°C and isolates that showed an increase of at least  $\geq 5$ mm diameter were designated as ESBL-phenotype strain. *E. coli* (ATCC 25922) and *K. pneumoniae* (ATCC 700603) were used as negative and positive controls for ESBL, respectively.

25

## **Antimicrobial susceptibility tests**

Susceptibility tests were performed by the disk diffusion method according to the guidelines of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) on all isolates, whether they were producers or non-producers of ESBL. Samples were streaked onto a Mueller-Hinton agar plate (Himedia, India) and incubated at 37°C for 24 h followed by the reading of the inhibition zone. Tests were conducted in the presence of 16 antibiotic disks (Laborclin, Brazil) containing: Amoxicillin (AMO, 10µg), Amoxicillin +

30

Clavulanic acid (AMC, 20/10µg), Ampicillin (AMP, 10 µg), Aztreonam (ATM, 30 µg), Cefalexin (CFX, 30 µg), Cefalotin (CFL, 30µg), Cefazolin (CFZ 30 µg), Cefepime (CPM 30µg), Cefotaxime (CTX,30 µg), Cefoxitin (CFO, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg) ceftriaxone (CRO 30 µg), Imipenem (IPM, 10 µg), Meropenem (MER, 10 µg), Oxacillin (OXA, 1 µg), and Penicillin G (PEN, 10U). All strains with intermediary resistance were considered resistant (MILLMANN *et al.*, 2013).

### ***B-lactamase gene detection by PCR***

All isolates were tested by PCR for detection of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. Chromosomal DNA was extracted through the incubation of cells grown overnight on nutrient agar (Difco, France) plates. The PCR mixture, with a final volume of 50 µL, contained 10 pmol/µL of each primer (1 µL) (table 1), 25 µL of PCR Master Mix (Thermo Scientific PCR Master Mix kit, USA (Waltham, MA, USA), 10 µL of template DNA, and 13 µL of ultrapure water (Smart Pure II, Thermo Scientific, Hungary). After an initial denaturation cycle of 94°C for 3 minute, a sequence of amplification was conducted following 35 cycles of denaturation (30 seconds at 95°C), annealing (52°C for 60 seconds), and two extension steps (72°C for 60 seconds and 4 minutes at 72°C) (Veriti, Applied Biosystems, USA). Samples were placed onto agarose gel wells (1.5%) for electrophoresis, stained with etidium bromide, and exposed in a UV transilluminator (DyNA Light, Labnet, USA) and images were documented with digital imager (Gel Logic 112, Carestream, USA), and PCR amplicons compared with a molecular weight marker (Ladder 100PB, Ludwig Biotex, Brazil).

In all PCR reactions the DNA of *K. pneumoniae* ATCC 700603 was used as a positive control for the detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes, while the DNA of *E. coli* ATCC 35218 was used for the *bla*<sub>TEM</sub> gene. ATCC strains were kindly furnished by the National Reference Laboratory for Enteric Diseases /Laboratory of Enterobacteria/ IOC / FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ – Brazil.

Table 1. Primers used for PCR detection and identification of β-lactamase genes.

GENE	Primers 5' – 3'	Amplicon size (PB)	Source
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	550	Jiang <i>et al.</i> 2006
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	TGGTTATGCGTTATATTCGCC GCTTAGCGTTGCCAGTGCT	867	Jiang <i>et al.</i> 2006
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	GCTCACCCAGAAACGCTGGT CCATCTGGCCCCAGTGCTGC	686	Ojdana <i>et al.</i> 2014

### **Ethical Approval**

This study was regulated by IBAMA SISBIO No. 18981-2 authorization for scientific activity and No. 11/2011-RJ authorization for the management of wild fauna for scientific activities. It was approved by the Ethical Committee for Animal Use (CEUA) of the Universidade Estadual do Norte Fluminense, under protocol No. 219.

### **RESULTS**

From 63 healthy Greater Rhea 74 samples collected by swab from cloaca, oropharynx, and feces samples, a total of 132 Gram-negative strains were obtained from 2012 to 2014 in the southern region of Brazil. Table 2 shows the  $\beta$ -lactamic antimicrobial susceptibility profile of the 86 *E. coli* and 14 *Klebsiella* spp. strains isolated. The most frequent resistant phenotype observed was to Cefazolin (38.34%) for *E. coli* strains, followed by cephalothin (30.24%) and amoxicillin (23.26). *Klebsiella* spp. showed the highest resistance towards cefalotin (28.57%), followed by cefazolin (14.29%). All isolates were susceptible towards ceftazidime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, meropenem, and imipenem. All strains were 100% sensitive towards  $\beta$ -lactamase inhibitor amoxicillin + clavulanic acid.

Table 2: Antimicrobial resistance profile against  $\beta$ -lactamic drugs of *E. coli* and *Klebsiella* spp. strains recovered from Great Rhea in Brazil.

Antimicrobial drugs	<i>E. coli</i>		<i>Klebsiella</i> spp	
	R%	S%	R%	S%
Penicillin G	-	-	100	0
Ampicillin	3,48	96,51	100	0
Amoxicillin	23,26	76,74	100	0
Oxacillin	-	-	100	0
Amoxicillin + clavulanic acid	0	100	0	100

Cephalothin	30,24	69,76	28,57	71,43
Cefazolin	38,34	61,66	14,29	85,71
Cefalexin	3,48	96,52	0	100
Cefoxitin	0	100	0	100
Cefotaxime	2,33	97,67	0	100
Ceftriaxone	0	100	0	100
Ceftazidime	0	100	0	100
Cefepime	0	100	0	100
Aztreonam	0	100	0	100
Meropenem	0	100	0	100
Imipenem	0	100	0	100

Screening and confirmatory tests conformed to CLSI (2012) guidelines, identifying 86 *E. coli* strains, with 11 strains (12.8%) confirmed as ESBL producers. None of the 14 *Klebsiella* spp. strains presented ESBL phenotype.

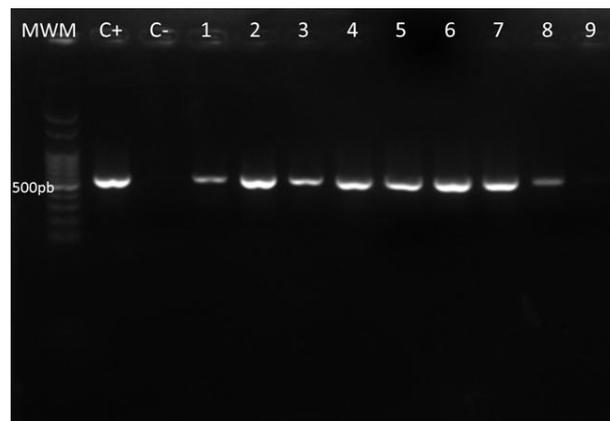
- 5 PCR using specific primers for  $\beta$ -lactamases types *bla*SHV, *bla*CTX-M, and *bla*TEM genes (Figures 2-4) revealed a variation in the occurrence of these genes among strains from captive Greater Rhea (Table 3). Data showed that the prevalence of SHV genes (37%) was higher than CTX-M genes (17%) or TEM genes (13%). *bla*CTX-M genes were observed only in *E. coli* strains (19/86; 22.1%), while *bla*SHV genes were 100% present in *Klebsiella* spp. strains and 26.7% present in *E. coli* strains.
- 10 Results revealed *bla*TEM genes among 14/100 strains, with 12 in *E. coli* and 2 in *Klebsiella* spp. Evaluation of more than one type of ESBL in the same strain showed that 3 strains were positive for TEM and SHV genes. Only one strain was positive for TEM and CTX-M genes, and in 9 strains a combination of SHV and CTX-M genes was detected. The presence of the three types of ESBL *bla* genes was not observed in the same strain, and genes codifying at least one of the three families of
- 15 ESBL was confirmed in 55% (55/100) of selected microorganisms, distributed in *Klebsiella* spp. 100% (14/14); *E. coli* 47.7% (41/86) (Table 3). Based on antimicrobial tests, the data shows a higher

sensitivity of molecular tests in the detection of ESBL-positive microorganisms when compared to conventional phenotypic tests carried out by other researchers (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Table 3: PCR reaction for detection of genes encoding the major ESBL families in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. recovered from Great Rhea, in Brazil.

Bacteria	CTX-M		SHV		TEM		CTX-M + SHV		CTX-M + TEM		SHV + TEM		CTX-M ou SHV ou TEM		Total	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
<i>Escherichia coli</i>	19	22,1	23	26,7	12	14	09	10,5	02	2,3	01	1,2	41	47,7	86	100
<i>Klebsiella</i> spp	0	-	14	100	02	14,3	0	-	0	-	02	14,3	14	100	14	100
Total	19	19	37	37	14	14	09	09	02	02	03	03	55	55	86	100

5



10 Figure 2: PCR product electrophoresis in 1.5% agarose. MWM: Molecular weight marker; C+: Positive Control (*K. pneumoniae* ATCC 700603); C-: Negative Control; 1-8: positive samples; 9: negative sample *bla*CTX-M gene (550 pb).

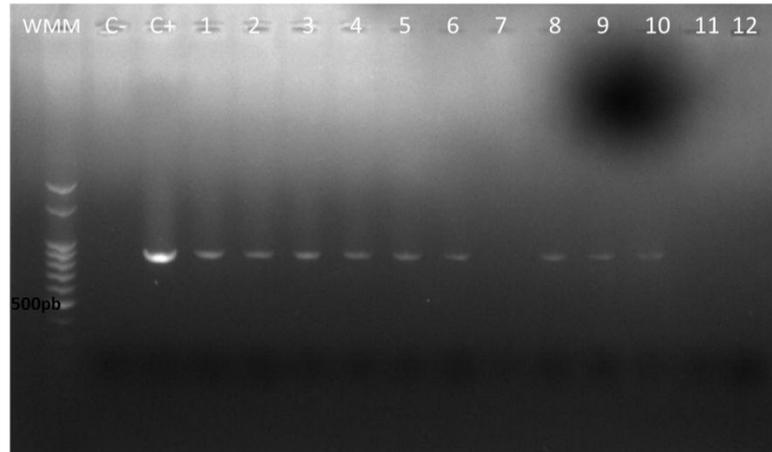


Figure 3: PCR product eletrophoresis in 1.5% agarose. WMM: Molecular weight marker; C+: Positive Control (*K. pneumoniae* ATCC 700603); C-: Negative Control; 1-6 and 8-10: positive samples; 7, 11 and 12: negative samples *blaSHV* gene (862 pb).

5

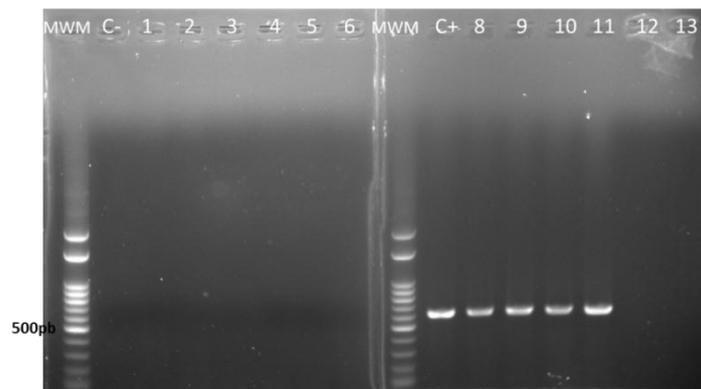


Figure 4: PCR product eletrophoresis in 1.5% agarose. MWM: Molecular weight marker; C+: Positive Control (*E. coli* ATCC 35218); C-: Negative Control; 1-6 and; 12-13: negative samples; 8-11: Positive samples *blaTEM* gene (686 pb).

10

## DISCUSSION

*E. coli* and *Klebsiella* spp. are frequently identified as both opportunistic infectious agents and as common digestion tract microorganisms in birds and other animal (GIBBS *et al.* 2007, MATTES *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010). In other ratite species, enteropathogenic *E. coli* was the most frequent bacteria causing enteritis in ostrich chicks (KEOKILWE *et la.*, 2015). Antimicrobial resistance among bacteria is a frequent and problematic issue and their insurgency in wild animals has been discussed inferring environmental contamination (GUENTHER *et al.*, 2010) because of the increasing importance of zoonotic diseases as well as the need for predicting emerging resistant pathogens (RADHOUANI *et*

*al.*, 2014).  $\beta$ -lactamase resistance represent the major mechanism of resistance of Gram-negative rods to  $\beta$ -lactamic drugs (CANTÓN *et al.*, 2008).

Over the last 25 years ESBL-positive bacteria has gained prevalence among hospital pathogens of clinical importance worldwide, most notably *K. pneumoniae*, followed by *E. coli* and other enterobacteriaceae (PATERSON *et al.*, 2003). Resistance rates to  $\beta$ -lactamic in the present work are considered low, but are important for identifying the presence of resistant strains with zoonotic potential in captive Greater Rhea. These animals may represent important reservoirs for antibiotic resistant strains. Several studies have shown high levels of resistant bacteria among wild birds, including birds that have never been treated with antibiotics (LIVERMORE *et al.* 2001, MIDDLETON and AMBROSE 2005, DEBOER *et al.* 2005, GIBBS *et al.* 2007). A portion of the Greater Rheas in the present study were maintained in a conservatory breeding farm, and in a University facility for scientific and research purposes, where the animals may have acquired resistant microorganisms due to contact with humans, other animals, or even with naturally-occurring and antibiotic-producer microorganisms that may confer resistance (GIBBS *et al.*, 2007). In addition to these factors, the resistance of microorganisms in the zoo animals may be associated with the use of antibiotics for therapeutic purposes or contact with wild birds fecal material and insect feeding. Resistance also may be acquired by mobile genetic elements such as plasmid, transposon, and integron that determine their spread among bacteria (FRICKE *et al.*, 2009). In feral pigs from Brazilian wetlands and from free-living and captive Brazilian maned-wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the emergence of pathogenic and antimicrobial resistant bacteria was attributed to contact of animals with surrounding environment, wild animals and livestock (LESSA *et al.*, 2011; VIEIRA-DA-MOTTA *et al.*, 2012).

The incidence of ESBL-enterobacteriaceae isolated from humans has been reported as high as 50% worldwide (CANTÓN *et al.*, 2008; COQUE *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; OJDANA *et al.*, 2014). While various bacterial species are important in terms of multiresistance and nosocomial infections in human and veterinary medicine, one must consider ESBL producing Gram-negative bacteria like ESBL-producing *E. coli* (ESBL-*E. coli*) a key indicator pathogen for tracing the evolution of multiresistant bacteria in the environment and wildlife among other microorganisms (RADHOUANI *et al.*, 2014). While the identification of ESBL-*E. coli* in animals was rare before 2005, its reported incidence has been rising (BONNEDAHL and JARHULT, 2014; COSTA *et al.*, 2006; GIBBS *et al.*, 2007; GUENTHER *et al.*, 2012).

Selected isolates in this study investigated *bla*SHV, *bla*CTX-M, and *bla*TEM genes from genomic material of suspected and unsuspected *E. coli*- and *Klebsiella* spp.- ESBL-producers (CLSI, 2012). A

substantial number of ESBL codifying genes have been described, but this work focused on *bla* genes, considered the most common ESBL-genes investigated (BUSH, 2010; COSTA *et al*, 2006; OJDANA *et al*, 2014; OLIVEIRA *et al*, 2009; POETA *et al*, 2008). Though the prevalence of ESBL-producing bacteria varies according to host and area of study, with *K. pneumoniae* and *E. coli* prevailing according to several studies (BONNEDAHL *et al*, 2014; CANTON *et al*, 2008; COQUE *et al*, 2008; COSTA *et al*, 2003; FREITAS *et al*, 2003; GIBBS *et al*, 2007; GUENTHER *et al*, 2010; JANATOVA *et al*, 2014; NASCIMENTO *et al*, 2003; OJDANA *et al*, 2014; POETA *et al*, 2008; ZHANG *et al*, 2011). In the present study the species with the highest positive PCR results for ESBLs was *Klebsiella* spp. While other researchers have shown ESBL- *E. coli* in wild birds, except in Australia and Antarctica (BONNEDAHL & JÄRHULT, 2014), and in humans and several animals (CANTÓN *et al*, 2008, POETA *et al*, 2008), it has never been reported in Greater Rhea.

The present data indicated a 100% presence of the *bla*SHV gene in *Klebsiella* spp. strains, and a 25.6% presence in *E. coli* strains from Greater Rhea. In other studies identifying *bla*SHV genes from microorganisms of animal origin, Bonnedahl *et al.* (2014), who identified SHV in all *Klebsiella pneumoniae* isolated from seagulls in Alaska, obtained similar results; Zou *et al.* (2011) and Kim *et al.* (2005) found 82.76% and 96% of *bla*SHV genes in *K. pneumoniae* from pigs on Chinese farms, and from food and environmental animal species on an American farm, respectively. In Holland, of 414 wild birds of different species, 65 were ESBL-*E. coli* positive with only 3 presenting the *bla*SHV gene (VELDMAN *et al*, 2013). In Portugal, wild animals presented the *bla* gene in *E. coli* from 72 animals with a prevalence of 12.5% of the strains; *bla*TEM was the most frequent, followed by *bla*CTX-M and only one strain had the *E. coli bla*SHV gene isolated from birds (COSTA *et al.*, 2006). Yet the identification of the *bla*SHV gene in animal strains is still rare. Most of ESBLs evolved through mutation in classical  $\beta$ -lactamases (TEM-1, TEM-2, and SHV-1). However, a new family of ESBLs, that of CTX-M, has emerged in recent years, mainly in *E. coli* isolates, and become an important family feature of these enzymes in bacteria from human and animal origin (OJDANA *et al* 2014, PEREZ *et al.* 2007, POETA *et al.* 2008). While for *bla*CTM-X genes none of *Klebsiella* spp. strains tested positive from Greater Rhea, these results do not exclude the possibility of occurrence of these genes in this species of bacteria (COQUE *et al*, 2008). Meanwhile, in *E. coli* strains a frequency of 19.8% of the same gene was found in Greater Rhea, and a similar result with 15.2% of the CTX-M gene was found in *E. coli* from vultures in Portugal (RADHOUANI *et al.*, 2010). For the CTX-M enzyme in *E. coli* the present data is discordant in terms of frequency involving *E. coli* isolated from different wild birds (BÁEZ *et al.*, 2015; VELDMAN *et al.*, 2013; GUENTHER *et al.*, 2012). One study correlated *E. coli bla*CTX-M-positive isolated from Greater Rhea (*Rhea americana*) with a strain of *E. coli* isolated from a sick tapir (*Tapirus terrestris*)

sharing the same space in a zoo in the Czech Republic (KLIMES *et al.*, 2013). Those authors discuss the propagation of resistant bacteria in environments with high animal density living conditions and the resulting fecal contact. Zhang *et al.* (2011) found ESBL type TEM in veterinary clinics in China. However, according to Guenther *et al.* (2008), epidemiological data for *bla*TEM-producing

5 microorganisms in animals are scarce. This study contributes to the epidemiology of these genes circulating among Greater Rhea, with low prevalence (14% 14/100) in *E. coli* strains (12/86) and *Klebsiella* spp. strains (2/14) hosting the *bla*TEM gene. The data is consistent with the low prevalence of this gene observed by Veldman *et al.* (2013) with only one ESBL-*E. coli* isolated from *Philomachus pugnax* in Holland, by Costa *et al.* (2006) who identified the *bla*TEM gene in 4% of *E. coli* strain from

10 two deer and one owl in Portugal, and by Carneiro *et al.* (2010), who identified 5.6% (3/54) in the *bla*TEM-positive *E. coli* isolated from captive ostrich in Portugal. Conversely, seagulls from a Natural Reserve in Portugal acted as reservoirs with 73% of *E. coli* strains carrying ESBL type TEM (POETA *et al.*, 2008). In China a high prevalence of *E. coli* strains obtained from pigs and birds (35/35) carrying the *bla*TEM gene was observed (ZHANG *et al.*, 2011). In addition, the occurrence of more than one type of

15 ESBL in the same isolate is quite common (ODJANA *et al.*, 2014). Here, 14% of strains presented two genes for ESBL production. Multiple ESBL genes were also observed, such as *Enterobacteriaceae* ESBL-positive in animals (CARNEIRO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2006; ODJANA *et al.*, 2014; POETA *et al.*, 2008; RADHOUANI *et al.*, 2010; VELDMAN *et al.*, 2013). The production of ESBLs by *Enterobacteriaceae*, specifically by *E. coli*, has been a cause of major concern in several countries,

20 being frequently implicated in human infections. Previous reports have described ESBL-containing *E. coli* strains in healthy wild animals (PINTO *et al.*, 2010; GUENTHER *et al.*, 2011). However, based on limited information regarding the prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and *bla* genes in captive wild animal, this method could help generate valuable data in this area of inquiry. In the present study although *Klebsiella* spp. strains were negative to genotyping for ESBL gene detection, it is

25 interesting to note that phenotyping tests showed 100% of strains resistant towards four beta-lactamic drugs: Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, and Oxacillin. Meanwhile, *E. coli* strains were clearly more resistant than *Klebsiella* strains and consistent with genotyping results. Considering that all animals involved in the study had minimum contact with antimicrobial drug treatment/supplements, these data suggest that bacteria resistant to some  $\beta$ -lactams may be present in the environment (Mamber and

30 Katz, 1985). Therefore, surveillance in animals, particularly wild animals, for zoonotic pathogens is critical in order to avoid human infection since pathogen surveillance in wildlife is less intensive to nonexistent, particularly in developing countries (KUIKEN *et al.*, 2005).

The data showed that molecular detection of ESBL-positive microorganisms are more reliable when compared to the phenotypic methods recommended by official regulatory agencies. *Klebsiella* spp. and *E. coli* isolated from captive Greater Rhea may carry ESBL resistance-related plasmid, suggesting that these birds may spread virulent bacterial strains to other animals and humans and may spread resistance genes into the environment.

## AKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ) for funding this research. Also to thank the zoo *Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, MG* (FZB-BH), the conservationary breeding farm *Itapemirim Camilo Cola Ecological Park* and to Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira from State University of Norte Fluminense (UENF), for animal access.

## REFERENCES

- 15 Agencia Nacional De Vigilancia Sanitária - ANVISA. Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto Clínico. Available in: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/gramn\\_lacta.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramn_lacta.htm). Acesso em: 04/04/2015.
- 20 Báez, J., Hernández-García, M., Guamparito, C., Díaz, S., Olave, A., Guerrero, K., Cantón, R., Baquero, F., Gahona, J., Valenzuela, N., Del Campo, R., and Silva, J. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. *Microb. Drug Resist.*, 21(1): 111-116, 2015.
- 25 Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, A., Kahlmeter, G., Waldenström, J., Johansson, A., and Olsen, B. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS ONE* 4: e5958., 2009.
- Bonnedahl, J., and Järhult, J.D. Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala J. Med. Sci.*, 119(2): 113-116, 2014.
- Bonnedahl, J., Hernandez, J., Stedt, J., Waldenström, J., Olsen, B., and Drobni, M. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in gulls, Alaska, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, 20(5): 897-899, 2014.
- 30 Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 39: 1211–1233, 1995.
- Bush, K., and Jacoby, G.A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 54(3): 969-976, 2010.

- Bush, K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit. Care*, 14(3): 224-231, 2010.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., and Baquero, F. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14: 144-153, 2008.
- Carneiro, C., Araújo, C., Gonçalves, A., Vinué, L., Somalo, S., Ruiz, E., Uliyakina, I., Rodrigues, J., Igrejas, G., Poeta, P., and Torres, C. Detection of CTX-M-14 and TEM-52 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in fecal *Escherichia coli* isolates of captive ostrich in Portugal. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7(8): 991-994, 2010.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-five informational supplement (M100-S22). Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA; 35(3), 2012.
- Coque, T. M., Baquero, F., and Cantón, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.*, 13(47): 5437-5453, 2008.
- Costa, Daniela, Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J. Torres, C. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemot.*, 58(6): 1311-1312, 2006.
- Deboer L.R., Slaughter D.M., Applegate R.D., Sobieski R.J., and Crupper S.S. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the faeces of wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *Appl. Microbiol.*, 33:382-386. 2005.
- Freitas A.L.P., Machado D.P, Soares F.S.C., and Barth A.L. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian Teaching Hospital: Detection, Prevalence and Molecular Typing. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 344-348, 2003.
- Fricke, W.F., Welch, T.J., Mcdermott, P.F., Mammel, M.K., Leclerc, J.F., White, D.G., Cebula, T.A., and Ravel, J. Comparative genomics of the incA/C multidrug resistance plasmid family. *J. Bacteriol.*, 191: 4750-4757, 2009.
- Giannoni, M.L. Emas & Avestruzés, uma alternativa para o produtor rural. Jaboticabal, FUNEP, 49p., 1996.
- Gibbs, P.S., Kasa, R., Newbrey, J.L., Petermann, S.R., Wooley, R.E., Vinson H.M., and Reed W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of members from the family Enterobacteriaceae from the feces of Yellow-Headed Blackbirds (*Xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. *Avian Dis.*, 51: 649-655, 2007.
- Góes, P.A.A., Cavalcante A.K. Da S., Nichi, M., Perez, E.G. De A., Barnabe, R.C., and Barnabe, V.H. Reproductive Characteristics of Captive Greater Rhea (*Rhea americana*) Males Reared in the State of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Poultry Sci.*, 12(1): 57 – 62, 2010.
- Guenther, S., Grobbel, M., Heidemanns, K., Schlegel, M., Ulrich, R.G., Ewers, C., and Wieler, L.H. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci. Total Environ.*, 408: 3519-3522, 2010.
- Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe. M., Batsajkham, N., Glupczynsk, Y., Wieler, L.H., and Ewers, C. Comparable high rates of extended-spectrum- $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One*, 7(12): 530-539, 2012.
- Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimic. Agents Chemot.*, 35(9): 1697, 1991.

IUCN . Bird Life international. Rhea americana. IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2., 2012. disponivel em: <http://www.iucnredlist.org/details/22678073/0> acesso 22/06/2015.

- Janatova A. M., Albrechtovaa, K., Petrzekovac, K.J., Dolejskaa, M., Papouseka, I., Masarikovab, M., Cizekb, A., Toddh, A., Shutt, K. Kalousovaf, B., Profousova-Psenkovaf, I., Modrye, D., and Literaka, I. Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic, Vet. Microbiol., 171(3-4): 422-431, 2014.
- Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F., and Lu, Y. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimic. Agents Chemot., 50(9): 2990-2995, 2006.
- Keokilwe, L., Olivier, A., Burger, W.P., Joubert, H., Venter, E.H., and Morar-Leather, D. Bacterial enteritis in ostrich (*Struthio Camelus*) chicks in the Western Cape Province, South Africa. Poultry Sci., 94(6):1177-83, 2015.
- Kim, S.H., Wei, C.I., Tzou, Y.M., and An, H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. J. Food Prot., 68(10): 2022-2029, 2005.
- Klimes,J., Machalkova, M., Dolejska, M., Cizek, A., Janoszowska, D., Alexa, P., Albrechtova, K., Vojtech, J., Literak, I. *Escherichia coli*-producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases CTX-M-15 in a captive south american tapir (*Tapirus terrestris*). J. Zoo Wildlife Med., 44(1): 173-175, 2013.
- Kuiken, T., Leighton, F.A., Fouchier, R.A.M., and Leduc, J.W. Pathogen surveillance in animals. Science, v. 309(5741):1680-1681, 2005.
- Lessa, S.S., Paes, R.C.S., Santoro, P.N., Mauro, R.A., and Vieira-da-Motta, O. Identification and antimicrobial resistance of microflora colonizing feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian Pantanal. Braz. J. Microbiol., 42: 740-749, 2011.
- Livermore, D.M., Warner, M., Hall, L.M., Enne, V.I., Projan, S.J., Dunman, P.M., Wooster, S.L., and Harrison, G. Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from West Wales. Environ. Microbiol., 3: 658-661, 2001.
- Livermore, D.M.  $\beta$ -lactamase in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev., 8: 557-584, 1995.
- Mamber, S.W., and Katz, S.E. Effects of antimicrobial agents fed to chickens on some gram-negative enteric bacilli. Appl. Environ. Microbiol., 50(3): 638-48, 1985.
- Mattes, B. R., Consiglio, S. De A.S., Almeida, B.Z. De, Guido, M.C., Orsi, R.B., Silva, R.M. Da, Costa, A., Ferreira, A.J.P., and Knöbl, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. Arq. Inst. Biol., 72(2): 13-16, 2005.
- Middleton, J.H., and Ambrose, A. Enumeration and antibiotic resistance patterns of fecal indicator organisms isolated from migratory Canada Geese (*Branta canadensis*). J. Wildlife Dis., 41: 334-341, 2005.
- Nascimento, A.M.A., Cursino, L., Gonçalves-Dornelas, H., Reis, A., Chartone-Souza, E., and Marini, M.A. Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in birds from the Brazilian Atlantic Forest. The Condor, 105: 358-361, 2003.
- Ojdana, D., Sacha, P., Wiczorek, P., Czaban, S., Michalska, A., Jaworowska, J., Jurczak, A., Poniatowski, B., and Tryniszewska, E. The Occurrence of *bla* CTX-M, *bla* SHV, and *bla* TEM Genes in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases-Positive Strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. Int. J. Antibiotics, 2014, Article ID 935842, 7 pages. doi.org/10.1155/2014/935842

- Oliveira, C.F., Dal Forno, N.L.F., Alves, I.A., Horta, J.A., Rieger, A., and Alves, S.H. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 42(5): 556-560, 2009.
- Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeisser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., and Bonomo, R.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimic. Agents Chemot.*, 47: 3554-3560, 2003.
- Paterson D.L, and Bonomo R.A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18: 657-686, 2005.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., and Bonomo, R.A. The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7(5): 459-469, 2007.
- Pinto, L., Radhouani, H., Coelho, C., Martins Da Costa, P., Simões, R., and Brandão, R. M. Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 4118–4120, 2010.
- Pitout, J.D., and Laupland, K.B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infec. Dis.*, 8:159–66, 2008.
- Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J., Vinue´, L., Somalo, S., and Torres, C. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(23): 7439-7441, 2008.
- Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Gonçalves, A., Sargo, R., Torres, C., Igrejas G., and Poeta, P. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *J. Antim. Chemot.*, 65(1): 171-173, 2010.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., and Igrejas, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Frontiers Microbiol.*, 5(23): 1-12, 2014.
- Santos, H.F., Flôres, M.L., Lara, V.M., Silva, M.S., Battisti, L., and Lovato, L.T. Cloacal microbiota identification and evaluation of the antimicrobial resistance in captive cracids from Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 3(12): 1077-1082, 2010.
- Stolker, A.A.M., and Brinkman, U.A.T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food producing animals - a review. *J. Chromat. A*, 1067: 15-53. 2005.
- Veldman, K., Van Tulden, P., Kant, A., Testerink, J., and Mevius, D. Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(24): 7556-7561, 2013.
- Weinstein, Robert A. Gaynes, Robert., Edwards, and Jonathan. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infec. Dis.*, 41(6): 848-854, 2005.
- Zhang, C.H., Zhang, X. G., Shen, Y. S., and Wang, L. Study on the Resistance of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *J. Anim. Vet. Advances*, 10(8): 1032-1036, 2011.
- Zou, L.K., Wang, H.N., Zeng, B., Zhang, A.Y., Li, J.N., Li, X.T., Tian, G.B., Wei, K., Zhou, Y.S., Xu, C.W., and Yang, Z.R. Phenotypic and genotypic characterization of  $\beta$ -lactam resistance in *Klebsiella pneumonia* isolated from swine. *Vet. Microbiol.*, 149(1): 139-146, 2011.

## 8 CONCLUSÃO

- Bactérias potencialmente patogênicas foram isoladas pela primeira vez nesta espécie animal;
- 5 • Nesse estudo, **pela metodologia utilizada**, não foram isoladas salmonelas dos animais estudados;
- Os microrganismos isolados no presente estudo são potencialmente patogênicos para o homem e outros animais, além de contaminarem o ambiente onde circulam estes animais e por poderem **carregar** genes de resistência e de fatores de patogenicidade;
- 10 • A presença de SCN produtores de enterotoxinas e **carregadores** do gene *mecA* na microbiota dos animais estudados são de grande importância para a saúde pública, sendo o primeiro relato nesta espécie animal;
- As emas de cativeiro e nos ambientes estudados podem eventualmente serem vítimas de infecção grave por bactérias potencialmente patogênicas;
- 15 • O isolamento de *Bordetella avium* dos animais pertencentes somente ao plantel conservacionista do Espírito Santo indica interferência ambiental importante do ponto de vista sanitário para o homem e animais.

20

25

## REFERÊNCIAS

- 5 ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2014. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/volume-exportado-de-carne-de-frango-mantem-alta-em-2014-1054>. Acesso em: 04/08/2015.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, 3 ed. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**. 2003. 989p.
- 10 AFSET, J. E., BEVANGER, L., ROMUNDSTAD, P., & BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1137-1144, 2004.
- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 60, p. 207-214, 1993.
- 15 ALDRIDGE, P. D., WU, C., GNERER, J., KARLINSEY, J. E., HUGHES, K. T., SACHS, M. S. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11340-11345, 2006.
- 20 ARANDA, K. R. S., FABBRICOTTI, S. H., FAGUNDES-NETO, U., SCALETSKY, I. C. A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 267, p.145-150, 2007
- AZEVEDO, C. S., FERRAZ, J. B., TINOCO, H. P., YOUNG, R. J., RODRIGUES, M. Time-activity budget of greater rheas (*Rhea americana*, Aves) on a human-disturbed area: the role of habitat, time of the day, season and group size. **Acta ethologica**, v. 13, p. 109–117, 2010.
- 25 BANNERMAN, T. L., PEACOCK, S. J., MURRAY, P. R., BARON, E. J., JORGENSEN, J. H., LANDRY, M. L., & PFALLER, M. A. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. **Manual of clinical microbiology**: Volume 1, n. Ed. 9, p. 390-411, 2006.
- 30 BARGIERI, D. Y., LEITE, J. A., LOPES, S. C., SBROGIO-ALMEIDA, M. E., BRAGA, C. J., FERREIRA, L. C., SOARES, I. S., COSTA, F. T., RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2818-2826, 2010.
- BARGIERI, D. Y., ROSA, D. S., BRAGA, C. J., CARVALHO, B. O., COSTA, F. T., ESPÍNDOLA, N. M., VAZ, A. J., SOARES, I. S., FERREIRA, L. C., RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, 26, (48), 6132-42 (2008).
- 35 BARROW, P. A.; TUCKER, J. F.; SIMPSON, J. M. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* gram-negative facultatively anaerobic bacteria. **Epidemiology and infection**, v. 98, n. 03, p. 311-322, 1987.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, n.45, p.493-496, 1966.
- 40 BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L. ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de Coalho. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.5, p. 1431-1438, ago. 2008.

- BRAGA, C. J., MASSIS, L. M., SBROGIO-ALMEIDA, M. E., ALENCAR, B. C., BARGIERI, D. Y., BOSCARDIN, S. B., RODRIGUES, M. M., FERREIRA, L. C. CD8+ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1373-1382, 2010.
- 5 BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Fundação Oswaldo Cruz**, Brasília, 60 p. (série A. Normas e manuais técnicos), 2011
- BRASIL.Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa conjunta n. 78**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Edição número 215. Poder Executivo, Brasília/DF, 5 jan. 2003. Secção 1, 2003.
- 10 BRESSAN, W. S. Ambiente térmico, qualidade do ar, bem-estar e desempenho produtivo de emas (*Rhea americana*) confinadas em fase de crescimento. Dissertação (Mestrado Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 76p., 2005.
- BRILHANTE, R. S. N., DE ALENCAR, L. P., DE AGUIAR CORDEIRO, R., CASTELO, D. D. S. C. M., TEIXEIRA, C. E. C., DE BRITO MACEDO, R., LIMA, D.T., PAIVA, M.A.N., MONTEIRO,A. J., ALVES, N.D., OLIVEIRA, M. F., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., BANDEIRA, T.J.P.G., RODRIGUES, T. D. J. S. Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. Pt 6, p. 889-895, 2013.
- 15 BRITTINGHEM, M.C, TEMPLE, S.A, DUNCAN, R.M, A Survey of the Prevalence of Selected Bacteria in Wild Birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 24(2): 299-307,1985.
- 20 CARLANDER, D., STÅLBERG, J., LARSSON, A. Chicken antibodies. A Clinical Chemistry Perspective. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 104, p. 179-190, 1999.
- CARVALHO, V. M. Colibacilose e salmonelose. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. e Catão-Dias J.L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo, p.742-750, 2006.
- CASTELLANOS-SUÁREZ, O. I., JIMÉNEZ-DÍAZ, T., MILIÁN-ELIAZÁBAL, M., CASANOVAS-COSÍO, E., BALBIS-CABRERA, SANTOS-PÉREZ, G. Reporte de campo y aislamiento de *Streptococcus* spp beta hemolítico en aves de línea ligera en el centro de Cuba. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 10, n. 2, 2009.
- 25 CASTRO-SILVA, M. A., MANOEL, F. C., KRUEGER, J., BARREIROS, M. A. B., BRANCO, J. O Identification of potentially pathogenic bacteria present in the human *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), on the coast of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, v. 19, n. 46, p. 6, 2013.
- 30 CHACANA, P. A., TERZOLO, H. R., GUTIÉRREZ CALZADO, E., SCHADE, R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 85, n. 5, p. 179-189, 2004.
- CHAN, K., BAKER, S., KIM, C. C., DETWEILER, C. S., DOUGAN, G., FALKOW, S. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of a *S. enterica* serovar Tiphymurium DNA microarray. **Journal of bacteriology**. v.185, p. 533-563, 2003.
- 35 CHANDRAN, A., MAZUMDER, A. Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1933-1940, 2014.
- 40 CLSI- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-five informational supplement (M100-S22). **Clinical Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pennsylvania, USA, v. 35, n. 3, 2012.
- CORRÊA, I. M. O. Enterobactérias e fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS. 54p. 2012.

- COSTA, G.A.; HOFER, E. Isolamento e identificação de enterobactérias. Monografia. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, 120 p., 1972.
- 5 CUNHA, M. D. L. R. D., PERESI, E., CALSOLARI, R. A. O., ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 70-74, 2006.
- CUNHA, M. L. R. S., CALSOLARI, R. A. O., ARAÚJO JUNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase negative *Staphylococci*. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.
- 10 DANI, S. U. A ema (*Rhea americana*): biologia, manejo e conservação. Fundação Acanguaçu, Belo Horizonte, MG. 136 p. 1993.
- DAVALOS-PANTOJA, L., ORTEGA-VINUESA, J. L., BASTOS-GONZALEZ, D., HIDALGO-ALVAREZ, R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **Journal of biomaterials science. Polymer**. v.11, p. 657-73, 2000.
- 15 DE ALMEIDA, R. M. A., DEL BIANCHI, M., NETO, M. C. G., DE SOUZA, R. R., CAMPOS, W. R. Microbiota da Orofaringe e fezes de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios: estudos preliminares. **Boletim de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2005.
- DE PAULA, V. S., DA SILVA, A. D. S., IFF, E. T., SILVA, M. E. M., KAPPEL, L. A., CRUZ, P. B., & PINTO, M. A. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 1, p. 102-106, 2011.
- 20 DIDIERLAURENT, A., FERRERO, I., OTTEN, L.A., DUBOIS, B., REINHARDT, M., CARLSEN, H., BLOMHOFF, R., AKIRA, S., KRAEHENBUHL, J. P., SIRARD, J. C. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **Journal Immunology**, v. 172, n.11, p. 6922-6930, 2004.
- 25 DOBBIN G., HARIBARON H., DAOUST P., HARIBARON S., HEANEY S., COLES M., PRICE L. & MUCKLE C.A. Bacterial flora of free-living Double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with reference to enteric bacteria and antibiotic resistance. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious**, v. 28, p. 71-82, 2005.
- EBINA, T. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. **Viral Gastroenteritis**, v. 12, p. 217, 1996.
- 30 Fu, C. Y., Huang, H., Wang, X. M., Liu, Y. G., Wang, Z. G., Cui, S. J., Kong, X. G. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. **Journal of Virological Methods**, v.133, p. 112-115, 2006.
- FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar o efeito de uso de probióticos, prebióticos e flora de exclusão competitiva. In: **Simpósio técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição**, n. 5, Balneário Camboriu, Santa Catarina, 2004.
- 35 GERWITZ, A. T., SIMON, P. O., SCHMITT, C. K., TAYLOR, L. J., HAGEDORN, C. H., O'BRIEN, A. D., NEISH, A. S., MADARA, J. L. *Salmonella* Typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia inducing a proinflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 99-109, 2001b.
- 40 GHOLAMI-AHANGARAN, Majid; ZIA-JAHROMI, Noosha. Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). **Toxicology and industrial health**, v. 30, n. 8, p. 724-727, 2014.
- GIANNONI, M. L. Emas e Avestruzes – uma alternativa para o produtor rural. Funep: Jaboticabal. 49 p., 1996.
- GOMES, C. M. B., OLIVEIRA, S. A., BEZERRA, L. M. Determinação de Enterobactérias da Avifauna silvestres em criadouro Conservacionista. **Biologia e Ciências da Terra**, v.13, n. 1, 2013.

- GOMES, C. M. B., OLIVEIRA, S. A., BEZERRA, L. M. Determinação de Enterobactérias da Avifauna silvestres em criadouro Conservacionista. **Biologia e Ciências da Terra**, v.13, n. 1, 2013.
- GOMES, C.M.B., OLIVEIRA, S. A., BEZERRA, L. M. Determinação de enterobactérias da avifauna silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, 2013.
- 5 GRESPAN, A., CAMERA, O., KNÖBL, T., GOMES, C. R., FELIZARDO, M. R., FERREIRA, T. S. P., MORENO, A. M. Virulence and molecular aspects of *Bordetella avium* isolated from cockatiel chicks (*Nymphicus hollandicus*) in Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 160, n. 3, p. 530-534, 2012.
- GUENTHER, S.; GROBBEL, M.; HEIDEMANNS, K.; SCHLEGEL, M.; ULRICH, R. G.; EWERS, C.; WIELER, L. H. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3519-3522, 2010.
- 10 GUIMARÃES, M. C. C., AMARAL, L. G., RANGEL, L. B. A., SILVA, I. V., MATTA, C. G. F., DE MATTA, M. F. R. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 57, p. 377-382, 2009.
- GUTIERREZ, M. A., MIYAZAKI, T., HATTA, H., KIM, M. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, p. 113–122, 1993.
- 15 HAGAN, W.A., BRUNER, D.W. Microbiology and infections diseases of domestic animals. 8 ed. United States of America: **Cornell University Press**, 915p., 1988.
- HAMADA, S. H. I. G. E. Y. U. K. I., HORIKOSHI, T., MINAMI, T., KAWABATA, S., HIRAOKA, J., FUJIWARA, T., OOSHIMA, T. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4161–4167, 1991.
- 20 HAN, J. E., HWANG, S. Y., KIM, J. H., SHIN, S. P., JUN, J. W., CHAI, J. Y., PARK, Y. H., PARK, S. C. CPR Methicillin resistant coagulase-negative staphylococci isolated from South Korean ducks exhibiting tremor. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 88, 2013.
- 25 HARRINGTON, A. T.; CASTELLANOS, J. A.; ZIEDALSKI, TOMASZ, M.; CLARRIDGE, J. E.; COOKSON, B.T. Isolation of *Bordetella avium* and novel bordetella strain from patients with respiratory disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 72, 2009.
- HATTA, H., TSUDA, K., AKACHI, S., KIM, M., YAMAMOTO, T., EBINA, T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, p. 1077–1081, 1993.
- 30 HAYASHI, F., SMITH, K. D., OZINSKY, A., HAWN, T. R., YI, E. C., GOODLETT, D. R., ENG, J. K., AKIRA, S., UNDERHILL, D. M., ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, 1099-1103, 2001.
- 35 HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9.ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 787p., 1994.
- HORIE, K., HORIE, N., ABDOU, A. M., YANG, J. O., YUN, S. S., CHUN, H. N., HATTA, H. Supressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4073-4079, 2004.
- 40 HULEATT, J. W., JACOBS, A. R., TANG, J., DESAI, P., KOPP, E. B., HUANG, Y., SONG, L., NAKAAR, V. POWELL, T. J. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, v. 25, p. 763-75, 2007.

- IKEMORI, Y., KUROKI, M., PERALTA, R. C., YOKOYAMA, H., KODAMA, Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 11, p. 2005-2008, 1992.
- 5 IKEMORI, Y., OHTA, M., UMEDA, K., ICATLO, F. C., KUROKI, M., YOKOYAMA, H., KODAMA, Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. **Veterinary microbiology**, v. 58, n. 2, p. 105-111, 1997.
- IUCN (2012). Bird Life international 2012. Rhea americana. IUCN **Red List of Threatened Species, version 2012.2**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/22678073/0>. acesso 22/06/2015.
- 10 JANSON, A. K., SMITH, C. E., HAMMARSTRÖM, L. Biological properties of yolk immunoglobulins. In: **Advances in Mucosal Immunology**. Springer US, p. 685-690, 1995.
- JIN, L. Z., BAIDOO, S. K., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg yolk antibodies. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 313-321, 1998.
- 15 JIN, L. Z., BAIDOO, S. K., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg yolk antibodies. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 21, p. 313-321, 1998.
- JIN, L., LI, X., ZOU, D., LI, S., SONG, W., & XU, Y. Protection of crucian carp (*Carassius auratus Gibelio*) against septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* using specific egg yolk immunoglobulins. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 928-936, 2013.
- 20 KAMIYAMA, Y., ADACHI, K., HANDHARYANI, E., SOEJOEDONO, R. D., KUSANO, T., INAI, M., TSUKAMOTO, Y. Protection from avian influenza H5N1 virus infection with antibody-impregnated filters. **Virology Journal**, v. 8, n. 54, p. 1-3, 2011.
- KAWANO, J., SHIMIZU, A., SAITOH, Y., YAGI, M., SAITO, T., & OKAMOTO, R. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2072-2077, 1996.
- 25 KLIMES, J., MACHALKOVA, M., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., JANOSZOWSKA, D., ALEXA, P., ALBRECHTOVA, K., VOJTECH, J., LITERAK, I. *Escherichia coli*-producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases CTX-M-15 in a captive south american tapir (*Tapirus terrestris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 1, p. 173-175, 2013.
- 30 KNOBL, T., SAIDENBERG, A., MORENO, A. M., GOMES, T. A., VIEIRA, M. A., LEITE, D. S., FERREIRA, A. J. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 916-921, 2011.
- 35 KOBAYASHI, H., SHIMADA, J., NAKAZAWA, M., MOROZUMI, T., POHJANVIRTA, T., PELKONEN, S., & YAMAMOTO, K. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 484-489, 2001.
- KRAUSE, G., ZIMMERMANN, S., BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary microbiology**, v. 106, n. 1, p. 87-95, 2005.
- 40 KUROKI, M., OHTA, M., IKEMORI, Y., PERALTA, R. C., YOKOYAMA, H., KODAMA, Y. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. **Archives of Virology**, v. 138, p. 143-148, 1994.
- LAMAITA, H. C., CERQUEIRA, M. M. O., CARMO, L. S., SANTOS, D. A., PENNA, C. F. A., SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

- LARSSON, A., WEJÅKER, P. E., FORSBERG, P. O., LINDAHL, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 156, p. 79- 83, 1992.
- LEE, E. N., SUNWOO, H. H., MENNINEN, K., SIM, J. S. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. **Poultry Science**, v.81, p. 632–641, 2002.
- 5 LEE, S. B., MINE, Y., STEVENSON, R. M. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 110–115, 2000.
- LIAUDET, L., MURTHY, K. G. K., MABLEY, J. G., PACHER, P., SORIANO, F. G., SALZMAN, A. L. SZABÓ, C. Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* serovar Muenchen flagellin and serovar Enteritidis lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 192-198, 2002.
- 10 LILLEHAUG, A., MONCEYRON JONASSEN, C., BERGSJO, B., HOFSHAGEN, M., THARALDSEN, J.,HANDELAND, K. Screening of feral pigeon (*Columba livia*), mallard (*Anas platyrhynchos*) and graylag goose (*Anser anser*) populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., avian influenza virus and avian paramyxovirus. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 46, p. 193-202, 2005.
- 15 MA, S.; ZHANG, Y. Preparation of immunoglobulin Y (IgY) against lipopolysaccharide using gel chromatography from the yolks of eggs laid by immunized hens. **The Protein Journal**, v. 29, n. 7, p. 475-80, 2010.
- MAHDAVI, A. H., RAHMANI, H. R., NILI, N., SAMIE, A. H., SOLEIMANIAN-ZAD, S. Chicken egg yolk antibody (IgY) powder against *Escherichia coli* O78:K80. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 2, p. 366-373, 2010.
- 20 MALIK, M. W., AYUB, N., QURESHI, I. Z. Passive immunization using purified IgYs against infectious bursal disease of chickens in Pakistan. *Journal of Veterinary Science*, v. 7, n. 1, p. 43-46, 2006.
- MARIANO, F.A., FOLLY, M. M., TEIXEIRA, G. N., DO CARMO, L. S., VIEIRA-DA-MOTTA, O. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 105-110, 2007.
- 25 MEENATCHISUNDARAM, S., PARAMESWARI, G., MICHAEL, A., RAMALINGAM, S. Neutralization of the pharmacological effects of cobra and krait venoms by chicken egg yolk antibodies. **Toxicon.**, v. 52, p. 221–227, 2008.
- MEHROTRA, M.; WANG G. *et al.*. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38. n.3, p. 1032 – 1035, 2000.
- 30 MELVILLE, P. A., COGLIATI, B., MANGIATERRA, M. B. B. C. D., PERES, M. R., MOURA, S. C. A., MATSUDA, L., BENITES, N. R. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1871-1876, 2004.
- 35 MEVILLE, P.A., BENITES, N. R., BRANDÃO, P.E., SAIDENBERG, A.B.S., PATRÍCIA BRACONARO, P., ZUNIGA, E., SILVA, A.J., THAÍS SANCHES, T., ZWARG, T. Caracterização da microbiota intestinal bacteriana e fúngica em passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de relocação. **Agência FAPESP**, 2014. Disponível em: [http://agencia.fapesp.br/pesquisa\\_detecta\\_bacterias\\_e\\_fungos\\_em\\_625\\_de\\_passarinhos\\_traficados/19558](http://agencia.fapesp.br/pesquisa_detecta_bacterias_e_fungos_em_625_de_passarinhos_traficados/19558). Acesso em 31/08/2015.
- 40 MINE, Y.; KOVACS-NOLAN J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, p. 159–169, 2002.
- NIE, R., WU, D., HU, G., ZHANG, J., YANG, H., & WEN, Z. Effect of specific egg yolk immunoglobulins on phagocytosis by neutrophils. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, v. 12, p.23–25, 2004

- NUNES, O. C. Animais silvestres e zoonoses: o exemplo da salmonelose em jabutispiranga (*Geochelone carbonaria*). 2007, 74p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2007.
- OTTO, M., 2010. Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial. *Expert Review of Dermatology*, v. 5, n.2, p. 183, 195, 2010.
- peptides. *Expert Rev. Dermatol.* 5, 183–195.
- PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. Farmacologia aplicada à avicultura: **Boas Práticas no Manejo de Medicamentos**. Editora Roca Ltda, 366p., 2005.
- PARIZZI, R. C., MIGLINO, M. A., MAIA, M. O., SOUZA, J. A., SANTOS, J. M., OLIVEIRA, M. F. & SANTOS, T. C. Morfologia do ovário da ema (*Rhea americana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.89–94, 2007.
- PENNYCOTT, T. W., PARK, A.; MATHER, H. A. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003 **Veterinary Record**. v.158, p. 817-820, 2006.
- PEREIRA, F. S. Sistemas de produção de emas (*Rhea americana*) nos criatórios comerciais da região sul do Brasil. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Agronomia). Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, SC., 63p. 2008.
- PEREIRA, R. A. Detecção de *Salmonella* sp em emas (*Rhea americana*): Estudos bacteriológicos, sorológicos e reação em cadeia da polimerase. **Tese** (Doutorado m Ciências Veterinárias) UFRS, 147 p., 2007a.
- PEREIRA, R. A., *et al.* Detecção de *Salmonella Anatum* em ema (*Rhea americana*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 823-825, 2008.
- PEREIRA, R. A., *et al.* Detecção de *Salmonella* sp. em emas (*Rhea americana*) através de suabes cloacais. **Acta Scientiae Veterinariae**. V. 35, p. 197-201, 2007b.
- PEREIRA, R. A., MACAGNAN, M., CANAL, C. W., SCHMIDT, V. Detecção sorológica e microbiológica de *Salmonella* spp. em emas (*Rhea americana*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Vol. 64, no. 4,(2012), p. 1077-1080, 2012.
- PRADO, R. R., FREITAS, E. A., VALADARES JÚNIOR, E. C., COSTA, P. C., SIQUEIRA, M. C., ROSSI, D. A. *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública. **PubVet**, , v. 9, n. 8, p. 363-368, 2015.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London, England, 648 p., 1994.
- RAFFEL, T.R., REGISTER, K.B., MARKS, S.A. *et al.*. Prevalence of *Bordetella avium* infection in selected wild and domesticated birds in the eastern USA. **Journal of Wildlife Diseases**, 38(1): 40–46, 2002.
- RAHIMI, S., SALEHIFAR, E., GHORASHI, S.A., GRIMES, J.L., TORSHIZI, M.A.K. The effect of egg-derived antibody on prevention of avian influenza subtype H9N2 in layer chickens. **International Journal of Poultry Science**. v.6, p. 207–210, 2007.
- RIBEIRO, A. M. L. Uso de gema de ovo de galinhas hiperimunizadas para vacinação de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 131-137, 2007.
- RIBEIRO, A. M. L., RUDNIK, L., CANAL, C. W., KRATZ, L. R., FARIAS, C. Uso de gemas de ovos de aves hiperimunizadas contra *Escherichia coli* suína no controle da diarreia neonatal de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1234-1239, 2005.
- ROSA, D.P. Avaliação da eficácia de ovos hiperimunizados (IgY) no controle de diarreia pós-desmame em leitões. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

- SACRISTÁN, C., ESPERÓN, F., HERRERA-LEÓN, S., IGLESIAS, I., NEVES, E., NOGAL, V., DE LA TORRE, A. Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. **Avian Pathology**, v. 43, n. 2, p. 172-175, 2014.
- 5 SAMPAIO, L. C. L. Imunoterapia com IgY aviária em ratos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi*. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2014.
- SANTOS, H. F., FLÔRES, M. L., LARA, V. M., SÁ E SILVA, M., BATTISTI, L., LOVATO, L. T. Cloacal microbiota identification and evaluation of the antimicrobial resistance in captive cracids from Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v. 30, n. 12, p. 1077-1082, 2010.
- 10 SCHADE, R., CALZADO, E. G., SARMIENTO, R., CHACANA, P. A., PORANKIEWICZ-ASPLUND, J., TERZOLO, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.33, p. 129–54, 2005.
- SCHUBERT, M. A. R. Isolamento de *Salmonella* spp de amostras fecais de aves silvestres mantidas em cativeiro. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Medicina Veterinária) Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo, SP. 27p. 2008.
- 15 SICK, H. Ornitologia brasileira, uma introdução. 2ª ed. Editora Universidade de Brasília. Brasília, DF., v. 1. p. 129-132, 1986.
- SICK, H. Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 914p., 2001.
- SILVA, J. B. Rheacultura criação de emas: manual prático nutrição, reprodução, manejo e enfermidades. Ed Guaíba: Agropecuária, p. 15-39, 2001.
- 20 SILVA, J. C. R. Zoonoses e doenças emergentes transmitidas por animais silvestres. Portal Educação. Mato Grosso do Sul. Acesso em: 20 de outubro de 2010. Disponível em: SOARES, H. S.; ALVES, N. D.; PEREIRA, R. H. M. A.; MATOS, S. M.; PENA, H.F.J.; FEIJO, M. C.; AMORA, S. S. A.; PEIXOTO, G. C. X. . Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 489-491, 2010.
- 25 SIM, J. S., SUNWOO, H. H., LEE, E. N. Ovoglobulin IgY. In: Naidu AS, editor. Natural food antimicrobial systems. New York: **CRC Press**, p. 227–252, 2000.
- SMITH K. D., ANDERSEN-NISSEN, E., HAYASHI, F., STROBE, K., BERGMAN, M. A., BARRETT, S. L. R., COOKSON, B. T. ADEREN, A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nature Immunology**, v. 4, n. 12, p. 1247-1253, 2003.
- 30 SMITH, W. A., MAZET, J. A., HIRSH, D. C. *Salmonella* in California wildlife species: Prevalence in rehabilitation centers and characterization of isolates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.*, v. 33, p. 228-235, 2002.
- SOARES, H. S., ALVES, N. D., PEREIRA, R. H. M. A., MATOS, S. M., PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., FEIJO´, F. M. C., AMO´RA, S. S. A. & PEIXOTO, G. C. X. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres de Mossoró´, Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 489–491, 2010.
- 35 SOARES, L.C., PEREIRA, I. A., COELHO, S. M. O., CUNHA, C. M. M., OLIVEIRA, D. F. B., MIRANDA, A. N., SOUZA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1346-1350, 2008.
- 40 STEVENSON, R.; FLETT, D.; RAYMOND, B. T. Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish. *Bacterial diseases of fish*, V. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, p. 80–105, 1993.

- SUGITA-KONISHI, Y., SHIBATA, K., YUN, S. S., HARA-KUDO, Y., YAMAGUCHI, K., & KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 60, p. 886–888, 1996.
- 5 SUI, J., CAO, L., LIN, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1946–1950, 2011.
- SUN, S., MO, W., JI, Y., LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.15, p. 708–12, 2001.
- 10 TSUBOKURA, K., BERNDTSON, E., BOGSTEDT, A., KAIJSER, B., KIM, M., OZEKI, M., HAMMARSTRÖM, L. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni* infected chickens. **Clinical & Experimental Immunology**, v.108, p. 451–455, 1997.
- 15 UEMATSU, S., FUJIMOTO, K., JANG, M. H., YANG, B-G., JUNG, Y-J., NISHIYAMA, M., SATO, S., TSUJIMURA, T., YAMAMOTO, M., YOKOTA, Y., KIYONO, H., MIYAKA, M., ISHII, K. J. AKIRA, S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll like receptor 5. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 769- 776, 2008.
- VAN NGUYEN, S., UMEDA, K., YOKOYAMA, H., TOHYA, Y., KODAMA, Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 62-64, 2006.
- 20 VERAS, J. F.; CARMÍ, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W. ; CUMMINGS, C. ; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases. Amsterdam**, v. 12, n 4, p. 410-415, 2008.
- WALKER, C., Streptococcal Infections in Birds. **Melbourne Bird Veterinary Clinic**, 2012. Disponível em: <http://www.melbournebirdvet.com/streptococcus-infections-in-birds.aspx>. Acesso em 01/09/2015.
- 25 WANG, L. H., LI, X. Y., JIN, L. J., YOU, J. S., ZHOU, Y., LI, S. Y., XU, Y. P. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 415–421, 2011.
- 30 WANG, B. Z., QUAN, F. S., KANG, S. M., BOZJA, J., SKOUNTZOU, I., COMPANS, R. W. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. **Journal of virology**, v. 82, n. 23, p. 11813-11823, 2008.
- WANG, X. Z., FAN, B., LIU, L. G., HU, X. Y., LI, R. Y., WEI, Y., DENG, X. L. *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**, v. 165, p. 381-387, 2008.
- WARR, G. W., MAGOR, K. E., & HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, p. 392–408, 1995.
- 35 XU, Y., LI, X., JIN, L., ZHEN, Y., LU, Y., LI, S., WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 860–868, 2011.
- YOKOYAMA, H., PERALTA, R. C., DIAZ, R., SENDO, S., IKEMORI, Y. , KODAMA, Y. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p. 998-1007, 1992.
- 40 YOKOYAMA, H., PERALTA, R. C., UMEDA, K., HASHI, T., ICATLO JR, F. C., KUROKI, M., KODAMA, Y. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal 35 calves, using orally administered chicken egg yolk Salmonella-specific antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 4, p. 416-20, 1998.

YOLKEN, R. H., LEISTER, F., WEE, S. B., MISKUFF, R., VONDERFECHT, S. Antibodies to rotavirus in chickens' eggs: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. **Pediatrics**, v.81, p. 291–295, 1988.

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

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

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