

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF**

FERNANDO LUIZ TOBIAS

**PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTE IGY DE AVESTRUZ (*STRUTHIO
CAMELUS*) IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE
ESCHERICHIA COLI E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2011

FERNANDO LUIZ TOBIAS

PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTE IGY DE AVESTRUZ (*STRUTHIO CAMELUS*) IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. DSc. Olney Vieira da Motta – LSA/CCTA/UENF.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2011

FERNANDO LUIZ TOBIAS

PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTE IGY DE AVESTRUZ (*STRUTHIO CAMELUS*) IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 29 de abril 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Enrique Medina Acosta - (PhD, Parasitologia Médica e Molecular) – UENF

Prof. Milton Masahiko Kanashiro - (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Paulo de Tarso Landgraf Botteon - (Doutor, Ciências Veterinárias) – UFRRJ

Prof. Olney Vieira da Motta - (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF
(Orientador)

Dedicatória

A todos que torcem por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradecer. Quando pensamos em agradecimentos, vem logo em nossas lembranças as pessoas que de maneira especial nos ajudaram. Não pensamos só nas pessoas que nos ajudaram na realização deste trabalho, mas em todas que estiveram presentes em cada degrau que subimos em nossas vidas. Na formação pessoal, na formação do caráter e na formação profissional. Alguns até nos acolhem como se fossemos irmãos e outros até como seus próprios filhos. Mas a todos eu quero deixar aqui registrado o meu “muito obrigado”.

Ao meu orientador professor Olney Vieira da Motta pela sua orientação, incentivo, respeito, dedicação e amizade demonstrados durante estes anos de trabalho. Com certeza um exemplo a ser seguido. Penso ser uma pessoa de sorte, pois sempre, tive orientadores com muita vontade e aptidão para trabalhar.

A minha esposa e companheira Neidi, minha filha Fernanda e meu filho Henrique, pelo apoio, compreensão, amor e carinho, que me deram força e coragem para seguir em frente. Vocês são realmente a razão de tanto esforço.

A todos os meus familiares que moram longe, mas sempre presentes na minha vida. Principalmente a minha mãe Anair e ao meu irmão Guilherme, que me apoiaram e estiveram na torcida para que eu seguisse nos estudos.

A Luize Néli Garcia, que nunca mediu esforços para me ajudar na pesquisa, sempre com muita boa vontade e dedicação.

Ao professor Enrique Medina Acosta e ao professor Víctor Martín Quintana Flores, pelas orientações e pelo fornecimento das proteínas recombinantes utilizadas no experimento.

Aos professores Milton Masahico Kanashiro e Claudia Almeida pela atenção e ajuda no desenvolvimento de etapas do trabalho em seus distintos laboratórios.

Ao professor Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira e ao Dr. Vagner Ricardo da Silva Fiúza do Laboratório de Parasitologia pelo fornecimento de material e pelas orientações.

Às técnicas, Maria de Lurdes, Gina e a Sueli e toda a equipe pertencente aos laboratórios de Sanidade Animal, pela atenção e pelos serviços prestados.

A Zila Souza de Macedo do LBT/CBB, pela ajuda em todos os momentos que precisamos.

Aos colegas de laboratório, principalmente Luciana, Sheyla, João Gatto e Luiz Antônio pela convivência, harmonia e valiosa ajuda. Mesmo que somente com uma conversa ou um sorriso.

Aos colegas de trabalho do Centro Universitário Vila Velha - UVV. Em especial ao professor Gilton Luiz Almada, que sempre me incentivou e dentro das suas possibilidades me ajudou a conciliar o trabalho com os estudos.

Aos colegas de viagem Odael, Renato, Thiago e Gustavo pelos momentos descontraídos que passamos na estrada. Juntos, vimos inúmeras cenas desagradáveis, mas não desanimamos e encontramos força para seguirmos em busca do nosso objetivo.

Ao pessoal do setor de transportes principalmente na pessoa do servidor “Vilarinho”, que nos ajudaram nas idas e vindas até as fazendas sempre com muita disposição.

Aos proprietários das fazendas Estação do Avestruz (Dr. Marconi de Luna), Campos Avestruz (Sr. José Felix) e Fazenda Dalla Patrícia (Sra. Patrícia Dalla) por permitirem a colheita de material e a realização do trabalho.

Ao veterinário Mosar Lemos pela colaboração com o trabalho na Estação do Avestruz em Saquarema.

Ao Paulo Drude de Lacerda pela amizade e pela colaboração na indicação da propriedade onde realizamos parte do experimento.

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela formação acadêmica e científica.

A FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro, viabilizando a realização do trabalho.

RESUMO

Gemas de ovos não fertilizados de avestruzes hiper-imunizadas foram utilizadas para o desenvolvimento de anticorpos IgY policlonais através da inoculação de proteínas recombinantes SECrec, RAPrec, EspBrec e BfpArec sendo os mesmos utilizados em testes de inibição de crescimento bacteriano. A especificidade de IgY de amostras de soro dos animais imunizados, foi testada por ELISA e Western blot. Além disso, é descrita a produção e avaliação de um conjugado anti-avestruz marcado com biotina desenvolvido em cabra e coelhos. Estudou-se o perfil de sensibilidade a vários antimicrobianos de 136 cepas de *Escherichia coli* e 12 *Staphylococcus aureus*, isolados das fezes e suabes de cloaca de avestruzes de três criadouros localizados em municípios dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. A especificidade dos anti-anticorpos marcados foi testada por ELISA contra amostras de soros de quatro espécies de aves, cinco mamíferos e um réptil. Os resultados demonstraram especificidade aos soros de avestruzes com títulos que variam entre 1:2.000 e 1:4.000 para futura utilização como ferramenta em testes imunoenzimáticos. Os anticorpos IgY anti SECrec, anti-RAPrec, anti-EspBrec e anti-BfpArec extraídos de gemas de avestruzes imunizados, foram capazes de reduzir o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* de diferentes origens *in vitro*. Quanto ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos, das cepas de *E.coli* e das cepas de *S. aureus* testadas, 34 (25%) e 12 (100%), respectivamente, apresentou resistência a pelo menos uma das drogas testadas.

Palavras chave: Estruticultura, imunodiagnóstico, inibição de crescimento, IgY, anticorpos biotinilados, resistência bacteriana.

ABSTRACT

Non fertilized yolks from ostriches immunized were utilized for developing of IgY polyclonal antibodies by inoculation of recombinant proteins SECrec, RAPrec, EspBrec and BfpArec and the antibodies tested in growth inhibition of bacteria. IgY specificity from serum samples from birds immunized were tested by ELISA and Western blot. We also describe the production and evaluation of a biotin marked anti-ostrich conjugate developed in goat and rabbit models. The antimicrobial profile towards several drugs of 136 *Escherichia coli* and 12 *Staphylococcus aureus* strains from fecal and swabs of birds from three farms localized in Rio de Janeiro State and Espírito Santo State was evaluated. The specificity of biotin marked anti-antibodies was tested by ELISA against serum samples from four species of birds, five species of mammal, and one species of reptile. The results showed specificity thru ostrich serum with titration varying from 1:2000 to 1:4000 to future utilization as a tool in immunoenzymatic diagnostics. The IgY anti-SECrec, anti-RAPrec, anti-EspBrec, and anti-BfpArec antibodies extracted from yolks of immunized ostriches were able to inhibit growth of *S. aureus* and *E. coli* from different sources in vitro. Results from antimicrobial profile of *E. coli* and *S. aureus* tested, 34(25%) and 12(100%), respectively, presented resistance towards at least one of the tested drugs.

Keywords: Estuthioculture, Imunodiagnostic, growth inhibition, IgY, biotinilates antibodies antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de SDS-PAGE de amostras extraídas com 20% de sulfato de amônia (S.A.) corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY das fêmeas após inoculação com proteínas recombinantes nos animais utilizados no experimento.....	52
Figura 2 - Gel de SDS-PAGE de amostras extraídas com 19% de sulfato de sódio (S.S.) corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY das fêmeas após inoculação das proteínas recombinantes nos animais utilizados no experimento.....	52
Figura 3 - Western blot utilizando soros frente as proteínas recombinantes inoculadas nos avestruzes.....	53
Figura 4 - D.O. de anticorpos IgY anti- RAP por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em galinha (comercial Sigma®).....	54
Figura 5 - D.O. de anticorpos IgY anti- RAP por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em coelho.....	54
Figura 6 - D.O. de anticorpos IgY anti- RAP por ELISA utilizando anticorpos anti- IgY produzido em cabra.....	55
Figura 7 - D.O. de anticorpos IgY anti- SEC por ELISA utilizando anticorpos anti-igY produzido em galinha (comercial Sigma®).....	55
Figura 8 - D.O. de anticorpos IgY anti- SEC por ELISA utilizando anticorpos anti-igY produzidos em coelho.....	56
Figura 9 - D.O. de anticorpos IgY anti- SEC por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em cabra.....	56
Figura 10 - D.O. de anticorpos IgY anti- BfpA por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em galinha (comercial Sigma®).....	57
Figura 11 - D.O. de anticorpos IgY anti- BfpA por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em coelho.....	57
Figura 12 - D.O. de anticorpos IgY anti- BfpA por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em cabra.....	58
Figura 13 - D.O. de anticorpos IgY anti- EspB por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em galinha (comercial Sigma®).....	58
Figura 14 - D.O. de anticorpos IgY anti- EspB por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em coelho.....	59
Figura 15 - D.O. de anticorpos IgY anti- EspB por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em cabra.....	59

Figura 16 – Atividade de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> utilizando IgY anti SECre e RAPrec extraídas de gemas de avestruzes após 4 horas de incubação.....	60
Figura 17 - Atividade de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> utilizando anticorpos IgY anti RAPrec, SECre extraídas com S.S. e S.A. de gemas de avestruzes pré e pós tratamentos.....	61
Figura 18 - Atividade de inibição de crescimento de <i>E. coli</i> utilizando IgY anti EspBrec e BfpArec extraídas de gemas de avestruzes após 4 horas de incubação.....	62
Figura 19 - Atividade de inibição de crescimento de <i>E. coli</i> (EPEC) utilizando anticorpos IgY anti BfpArec e EspBrec extraídas com S.S. e S.A. de gemas de avestruzes pré e pós tratamentos.....	62
Figura 20 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY amostra C19 utilizada para purificação e inoculação dos animais.....	63
Figura 21 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie .Perfil eletroforético da IgY amostra C19 antes e após a passagem pela coluna de purificação HiTrap™ IgY.....	64
Figura 22 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY amostra C19 antes e após a passagem pela coluna de purificação HiTrap™ IgY.....	64
Figura 23 – Titulo de anticorpos por ELISA de IgG de coelho anti-IgY – coelho nº 1.....	65
Figura 24 – Titulo de anticorpos por ELISA de IgG de coelho anti-IgY – coelho nº 2.....	65
Figura 25 – Titulo de anticorpos por ELISA de IgG de coelho anti-IgY – coelho nº 3.....	66
Figura 26 – Titulo de anticorpos por ELISA de IgG de cabra anti-IgY – cabra nº1.....	66
Figura 27- Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. IgG de coelho purificada pelo ácido caprílico e sulfato de Amônia seguido da purificação pela coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G.....	67
Figura 28 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. IgG de cabra purificada pelo ácido caprílico e sulfato de Amônia seguido da purificação pela coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G.....	68
Figura 29 - Intensidade de proteínas utilizando o método do ácido biscinonínico – IgG biotinizada de cabra.....	69
Figura 30 - Intensidade de proteínas utilizando o método do ácido biscinonínico – IgG biotinizada de coelho.....	69
Figura 31 - Titulação por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY	

de avestruz produzido em coelho frente a diferentes soros de aves e réptil.....	70
Figura 32 - Titulação por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em cabra frente a diferentes soros de aves e réptil.....	70
Figura 33 - Titulação por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em coelho frente a diferentes soros de mamíferos.....	71
Figura 34 - Titulação por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em cabra frente a diferentes soros de mamíferos.....	71
Figura 35 - Gel de agarose 1% demonstrando produtos de PCR amplificados a partir do gene estrutural para BfpA.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas de imunização das avestruzes com proteínas recombinantes SEC _{rec} e RAP _{rec} e EspB _{rec} e BfpA _{rec} para obtenção de IgY.....	38
Tabela 2 - Etapas de imunização em cabra e coelhos utilizados para produção de anticorpos anti-IgY.....	44
Tabela 3 - Gên, sequencia de oligonucleotídeo, tamanho do produto amplificado em pares de base e temperatura de anelamento utilizado.....	50
Tabela 4 - Tabela 4 - Concentrações de IgY extraídas de gema de ovos de avestruzes utilizados no experimento com Sulfato de Sódio a 19% ou Sulfato de Amônia a 20%.....	51
Tabela 5 - Tabela 5 - Resultado de antibiogramas de <i>E. coli</i> isoladas de avestruzes em propriedades dos estados Rio de Janeiro e Espírito Santo.....	73
Tabela 6 - Resultado de antibiogramas de cepas de <i>E. fergusonii</i> isoladas de avestruzes em propriedades dos estados Rio de Janeiro e Espírito Santo.....	73
Tabela 7 - Resultado de antibiogramas de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de avestruzes em propriedades dos estados Rio de Janeiro e Espírito Santo.....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 O Avestruz	17
2.2 <i>Escherichia coli</i>	20
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.4 Utilização de Imunoglobulinas IgY	25
2.4.1 A IgY	25
2.4.2 Imunização das aves	27
2.4.3 Extração da IgY dos ovos	28
2.4.4 Utilização terapêutica e profilática da IgY	29
2.4.4.1 Em animais de produção	29
2.4.4.2 Em outras espécies de animais	31
2.4.4.3 Em Medicina humana	31
2.4.4.5 Utilização da IgY como ferramenta para imunodiagnóstico	34
3 OBJETIVOS	36
4 JUSTIFICATIVA	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Desenvolvimento e avaliação da ação de anticorpos IgY produzidos em avestruzes imunizados contra proteínas recombinantes provenientes de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	37
5.1.1 Imunização das aves	37
5.1.2 Colheita de sangue	38
5.1.3 Colheita de ovos	38
5.1.4 Purificação de anticorpos IgY de gemas das avestruzes inoculadas	38
5.1.5 Quantificação de proteínas	39
5.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida	39

5.1.7 ELISA para avaliação dos anticorpos no soro das fêmeas inoculadas com proteínas recombinantes.....	40
5.1.8 Western blot.....	41
5.1.9 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti SEC_{rec}, RAP_{rec} e EspB_{rec} e BFPA_{rec}, sobre o crescimento de cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>.....	42
5.1.9.1 Análise Estatística.....	42
5.2 Produção e avaliação de anticorpos anti-avestruz através da inoculação de IgY purificada em coelhos e cabra.....	43
5.2.1 Purificação de anticorpos IgY utilizando kit com coluna de afinidade HiTrap™ IgY (GE).....	43
5.2.2 Imunização dos animais com IgY purificada para produção de anti-IgY.....	43
5.2.3 Titulação dos soros dos coelhos e cabra através do teste de ELISA.....	44
5.2.4 Purificação do soro hiperimune (IgG) de coelho e cabra utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia.....	45
5.2.5 Purificação de IgG de soro utilizando coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G.....	46
5.2.6 Biotinilação de anticorpos IgG de coelho e cabra anti-IgY de avestruz.....	46
5.2.7 Avaliação da especificidade da IgG marcada com biotina Anti-IgY de avestruzes frente a anticorpos de diferentes espécies animais através de ELISA.....	46
5.3 Determinação da presença de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em fezes de avestruzes (<i>Struthio camelus</i>) em criações dos Estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo.....	47
5.3.1 Colheita de Fezes.....	47
5.3.2 Isolamento bacteriano.....	48
5.3.3 Caracterização bacteriana.....	48
5.3.4 Análise do Perfil de sensibilidade a antimicrobianos.....	48
5.3.5 Análise molecular.....	49
5.3.5.1 Extração de DNA.....	49
5.3.5.2 Realização do PCR.....	50
6 RESULTADOS.....	51

6.1 Desenvolvimento e avaliação da ação de anticorpos IgY produzidos em avestruzes imunizados contra proteínas recombinantes de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	51
6.1.1 Extração e Purificação de anticorpos IgY de gema de ovos de avestruzes.....	51
6.1.2 Western blot.....	53
6.1.3 Titulação por ELISA de IgY do soro das avestruzes inoculadas com proteínas recombinantes utilizando anticorpos anti-avestruz desenvolvidos em coelho e cabra.	53
6.1.4 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti-SEC _{rec} , anti-RAP _{rec} e anti-EspB _{rec} e anti-BfpA _{rec} , sobre o crescimento de cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	60
6.1.4.1 Inibição sobre o crescimento de cepas de <i>S. aureus</i>	60
6.1.4.2 Inibição sobre o crescimento de cepas de <i>E. coli</i>	61
6.2 Produção e avaliação da utilização de anticorpos anti-avestruz IgY.....	63
6.2.1 Purificação de anticorpos- IgY utilizando coluna de afinidade HiTrap™ IgY ...	63
6.2.3 Titulação do soro dos animais pelo teste de ELISA.....	65
6.2.4 Purificação de IgG de soro utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia e coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G.....	67
6.2.5 Biotinilação de anticorpos IgG de coelho e cabra anti-avestruz (Kit Immunoprobe Biotinylation™ – Sigma).....	68
6.2.6 Avaliação da especificidade da IgG marcada com biotina Anti-IgY de avestruzes frente a anticorpos de diferentes espécies animais.....	69
6.3 Determinação da presença de <i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> e <i>S. aureus</i> em fezes de avestruzes (<i>Struthio camelus</i>) em criações dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.....	71
6.3.1 Isolamento de <i>E. coli</i> e <i>E. fergusonii</i>	72
6.3.1.1 Perfil de sensibilidade e resistência a antimicrobianos de isolados de <i>E. coli</i> e <i>E. fergusonii</i>	72
6.3.1.2 Análise molecular de isolados de <i>E. coli</i>	74
6.3.2 Isolamento de <i>S. aureus</i>	74
6.3.2.1 Perfil de sensibilidade e resistência a antimicrobianos de isolados de <i>S. aureus</i>	75
7 DISCUSSÃO.....	76

8 CONCLUSÕES.....	83
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
10 ANEXOS.....	97

INTRODUÇÃO

O Brasil tem se revelado, como um dos países com grande potencial em produção de aves. Entre elas, a criação de avestruzes (*Struthio camelus*), ave pertencente ao grupo das ratitas (aves que não voam) Estas, tem crescido exponencialmente entre os mercados da comunidade mundial (MARINHO; MEIRELES e SOUZA 2004).

Bactérias e fungos que muitas vezes fazem parte da microbiota dos avestruzes, podem ser fonte de autocontaminação. Dependendo das condições físicas e imunológicas do animal, podem ocasionar patologias graves. Portanto, o conhecimento da mesma pode auxiliar na etiologia de doenças, assim como, servir de parâmetros para eventuais medidas de controle das infecções.

A presença de micro-organismos resistentes aos antibióticos no meio rural, principalmente na área veterinária, está relacionada ao uso indiscriminado de drogas no tratamento contra as doenças, ganho de crescimento e eficiência alimentar para animais em diferentes espécies (TEUBER, 2001; CARNEIRO et al., 2010).

Existem descritos na literatura vários trabalhos envolvendo a contaminação por *Escherichia coli* (*E. coli*). Melville et al. (2004), por exemplo, em trabalho feito no Brasil, isolaram bactérias da cloaca de avestruzes potencialmente patogênicas. Destas bactérias patogênicas pode-se ressaltar bactérias como *E. coli*, e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), entre outras. A *E. coli*, geralmente, permanece sem causar dano, quando confinada ao lúmen intestinal, entretanto, em indivíduos debilitados ou imunossuprimidos, ou ainda, quando as barreiras imunes do trato gastrointestinal são vencidas, mesmo as espécies não patogênicas podem causar infecções (NATARO e KAPER, 1998).

No norte do estado do Rio de Janeiro, Vieira-da-Motta et al. (2008) relatam um surto de óbito em avestruzes, desde a eclosão até quatro meses de idade. Neste trabalho, a bactéria mais isolada dos animais investigados foi a *E. coli*, sugerindo a maior participação do micro-organismo no óbito das aves.

Janantigh (2010) cita os principais causadores de morte embrionária em avestruzes através de cultura bacteriana. Em ordem, os percentuais de isolamento encontrados foram 45% de *Bacillus spp.*, 25% de *Staphylococcus spp.*, 15% de *Klebsiella spp.*, 10% de *E. coli* e 5 % de *Proteus*.

Frente à evidência da contaminação por diferentes micro-organismos, há 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 *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e outros micro-organismos (GUIMARÃES et al., 2009; MA e ZHANG, 2010; KAMIYAMA et al., 2011).

Além disso, informações disponíveis na literatura, sobre doenças infecto-contagiosas em avestruzes, estão restritas ao uso de kits comerciais para detectar estas doenças, baseado, no uso de anticorpos anti-galinha, de menor especificidade ou não reagentes com anticorpos de avestruzes (CADMAN et al., 1994; FERNANDES et al., 2010). 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, entre elas, IgY contra enterotoxina estafilocócica C recombinante (SEC), de origem bovina, para o diagnóstico de enterotoxemias causadas por SEC ou como imunoterápico (UHL et al., 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Avestruz

A origem dos avestruzes remonta desde os tempos dos dinossauros. Nos primórdios, um fóssil, com cerca de 80 milhões de anos, encontrado na Mongólia, foi considerado uma das primeiras provas diretas que, os dinossauros cuidavam dos filhotes e que a incubação dos ovos, observada nas aves, existia muito antes de surgirem As aves modernas. Diversos países possuem em seus históricos registros desse animal. Na China, foram encontrados em cavernas, cascas de ovos dessa ave, contando 30 mil anos; na Etiópia, o ovo era considerado mágico; no Egito, suas penas eram comercializadas e simbolizavam a justiça e a paz; na Grécia e Roma, suas penas eram utilizadas em vestimentas oficiais e a própria ave era utilizada pela nobreza para cavalgadas; na África, as aves eram utilizadas na alimentação e suas plumas como adornos e no Iraque, a ave era considerada um pássaro divino. Originário de regiões semi-áridas e planas (savana africana), na altura do Trópico de Capricórnio, o avestruz tem grande capacidade de adaptação a climas adversos, de forma, que sua criação comercial tem apresentado resultados positivos em países como: Canadá, Estados Unidos, Europa, Israel e Brasil (CARRER et al., 2004). Hosken e Silveira (2001) relatam que a estruturacultura moderna nasceu do interesse que a sociedade do final do século passado tinha pelas plumas dessa ave, essas, eram obtidas de populações silvestres de avestruzes. A utilização das plumas das mesmas em vestimentas foi popularizada no mundo da moda, durante o século XIX e primeiros anos do século XX. Essas plumas eram importadas da África do Norte, Arábia e Palestina, sendo obtidas através da caça aos animais.

O avestruz está classificado na superordem *paleognathae*, que são aves da subclasse *neornithes*, caracterizadas pela ausência de carena e dotadas de asas rudimentares, sem capacidade de vôo. A ordem *Struthioniformes*, com uma única espécie *Struthio camelus* e seis subespécies, da qual são comercialmente divididas em três grandes grupos que se baseiam na coloração da pele pelos adultos. *Red neck* (pescoço vermelho), *Blue neck* (pescoço azul) e *Black neck* ou *African Black* (pescoço preto) que é a variedade doméstica. O grupo das ratitas é composto pelas seguintes espécies: Avestruz (*Struthio camelus*), Ema (*Rhea americana* e *Pterocnemia pennata*), Emu (*Dromaius novaehollandiae*), Casuar (*Casuaris sp.*), Kiwi

(*Apteryx sp.*). As espécies mais exploradas comercialmente são: o avestruz, a ema e o emu (SOUZA,2006).

De acordo com Giannoni (2002), a carne de avestruz desperta grande interesse no mercado de produtos cárneos, devido às suas propriedades como cor, maciez e aspectos nutricionais, bem como, nas suas características físico-químicas, especialmente composição de ácidos graxos (ômega 3 e 6) que são essenciais para a prevenção e tratamento de doenças crônicas, possuindo também alto teor de ferro, dentre outros.

No Brasil, o avestruz passou a ser considerado um animal doméstico no início de 2002. Em fevereiro de 2003, com Instrução Normativa nº 02, as normas regulatórias para o setor foram estabelecidas, passando efetivamente a ser uma atividade pecuária passível de inspeção e fiscalização pelo SFFA (Serviço de Fomento e Fiscalização Animal) do Ministério da Agricultura. A Estrutiocultura está ordeiramente dentro do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), e a importação de ovos férteis de avestruz, objetivando a formação de plantel, ocorre dentro dos mais rigorosos protocolos sanitários de acordo com Ministério da Agricultura (MUNIZ, 2004).

O primeiro criatório comercial de avestruzes no Brasil foi implantado em Bragança Paulista (SP), em maio de 1995 pela NovAvis Avestruzes do Brasil Ltda (RIBEIRO e MUNIZ 2007).

Muniz (2004), afirma que, a estrutiocultura é uma atividade que permite o desenvolvimento de vários mercados. Os principais produtos oriundos da exploração comercial de avestruzes compreendem: pluma, couro, carne e ovos. O couro corresponde a 60% do valor obtido com os produtos gerados pelo avestruz, sendo o produto de maior valor de mercado. Considerando a tendência mundial, a carne e o couro encontram condições favoráveis de atratividade para a formação de um mercado interno. O mercado brasileiro é o maior consumidor mundial de plumas de avestruzes, dado o consumo das mesmas, na época do carnaval e das indústrias automobilísticas, em sua totalidade, importadas. As plumas podem ser obtidas de aves de até 40 anos de idade. Porém, as de melhor qualidade são aquelas obtidas quando as aves estão com idade entre 3 a 12 anos. Um avestruz produz de 35 a 40 kg de carne. Análises da carne (100g de carne cozida) indicaram os seguintes valores médios: Proteína 26,9%; Gordura: 3,0g; Calorias 142 Kcal; Ferro 3,2 mg e Colesterol 81 mg. Os preços variam conforme a procedência e o tipo de corte (GIANNONI 2002).

Em condições normais, uma fêmea põe de 30 a 40 ovos em média, por ano, concentrados no período reprodutivo. A fêmea, no pico de postura, irá produzir um ovo a cada dois dias. Numa estação reprodutiva, uma fêmea poderá fazer uma postura de 15 a 70 ovos,

variando de acordo com fatores individuais, qualidade genética, nutrição e potencial reprodutivo (KORNFELD et al., 2004).

De acordo com Giannoni (2004), apesar do aparente sucesso da estrutiocultura no Brasil, a atividade está enfrentando os mesmos problemas mundiais, como: o elevado custo da produção devido aos altos investimentos com infra-estrutura, a relativa baixa produção de ovos, elevada mortalidade dos pintinhos, os elevados custos das rações e a falta de comprometimento no desenvolvimento de uma Estrutiocultura Industrial, agravados por exigir um sistema intensivo de trabalho. Um dos maiores problemas é a elevada mortalidade embrionária, reduzindo a produção para 14 animais por ano, ou seja, menos de 30% de aproveitamento dos ovos postos. No país de origem da estrutiocultura os problemas eram semelhantes; em 1997, dos mais de 1 milhão de ovos de avestruzes coletados, apenas 65% eclodiram, com cerca de 20% inférteis (200 mil ovos desperdiçados).

Apesar de fazer parte da Classe Aves, as comparações feitas com o avestruz, são geralmente feitas com a produção em bovinos. Análises econômicas realizadas nos EUA, no ano de 1994 (na denominada fase de reprodutores), indicavam ser o avestruz 15 vezes mais rentável que o bovino. Hoje, na fase de comercialização dos produtos, os valores são bem diferentes. Portanto, estes cálculos estão sujeitos às flutuações do mercado.

Segundo Elmôr et al. (2004), os avestruzes sofreram grande pressão ambiental e sua adaptabilidade a lugares inóspitos gerou um grau de rusticidade nestas aves pouco visto em outros animais de criação. O Brasil por ser um país tropical, com temperaturas médias elevadas, altos índices de umidade e matéria orgânica em abundância proporciona o crescimento de micro-organismos que não acometem os ambientes semi-áridos ou desérticos. Portanto, os cuidados referentes às questões sanitárias devem ser redobrados durante todas as fases de criação.

Infelizmente não existem dados atuais sobre a estrutiocultura no Brasil. Em 2008, O plantel brasileiro tinha cerca de 450.000 exemplares, entre reprodutores e animais criados para abate. Com esse plantel, o Brasil ocupava a posição de segundo maior produtor de avestruzes do mundo. É importante salientar que na época a densidade das criações havia aumentado em cerca e 32%, passando de 134 aves/criador para 177 aves/criador, caracterizando potencialmente que os produtores estavam com melhores índices de produtividade e, conseqüentemente, investindo na criação, só que agora, com o foco na cadeia produtiva, e não mais, na venda de reprodutores e matrizes (UBA, 2008).

2.2 *Escherichia coli*

A *E. coli* tem comprovado papel como patógeno entérico e extraintestinal levando a infecções no homem e nos animais (RON, 2006). É uma bactéria aeróbica pertencente à família Enterobacteriaceae, gênero *Escherichia*. É considerada integrante da microbiota intestinal de bovinos e aves, com uma população dinâmica, observando-se, ultimamente, uma contínua renovação da população por tipos cada vez mais resistentes, inclusive a antibióticos, havendo uma troca da microbiota original por cepas de resistência múltipla (HINTON et al., 1985).

As *E. coli* podem ser classificadas em grupos, de acordo com as características individuais de patogenicidade: ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica), EHEC (enterohemorrágica), STEC (shigatoxigênica), EIEC (enteroinvasiva), EAEC (enteroagregativa) e DAEC (difusamente aderente) (NATARO e KAPER, 1998). As *E. coli* patogênicas para as aves (APEC) causam, com frequência, infecções extraintestinais (ExPEC), e são agrupadas de forma generalizada nas denominadas colibaciloses das aves (LAMARCHE et al., 2005). Ressalta-se a importância das cepas APEC na sanidade avícola, uma vez que podem determinar uma síndrome complexa, caracterizada por lesões em múltiplos órgãos determinando: septicemia, perihepatite, pericardite, celulite, problemas respiratórios severos e entéricos (NAKAZATO et al., 2009).

Cepas patogênicas de *E. coli* excretam, pelo menos, cinco produtos importantes: enterotoxinas (ETEC) sideróforos, toxina shigela-símile (verotoxina), fator citotóxico necrotizante e hemolisina. Normalmente, as enterotoxinas são proteínas codificadas por plasmídeos e ocorrem sob duas formas: Uma toxina termolábil (LT) e outra termoestável (ST). Existem duas subclasses distintas de LT. A LT I que foi isolada de *E. coli* acometendo humanos (LTh-1) e suínos (Ltp-1) e a LTII que foi isolada de bovinos, búfalos, humanos, avestruzes e alimentos (HIRSCH e ZEE, 2003; NARDI et al., 2005).

As cepas patogênicas de *E. coli* que produzem verotoxinas (VTEC) entre elas VT1, VT2 e VTe são reconhecidas por causarem “Doença do edema” em suínos, enterocolite hemorrágica em bezerros, diarreia pós-desmame em leitões, além de causar uma Síndrome da colite hemolítico-urêmica hemorrágica em humanos (BLANCO et al., 1997; QUIN et al., 2005). *E. coli* produtoras de fatores citotóxicos necrotizantes (CNF) entre eles CNF1 e CNF2, causam lesões diretas em enterócitos e vasos sanguíneos. A produção de tais fatores tem sido associada a manifestações clínicas como a colite hemorrágica em bovinos, enterite em leitões

e bezerros, diarreia em coelhos, disenteria em equinos, além, de uma infecção extraintestinal em humanos (HIRSCH e ZEE, 2003).

Cepas de *E.coli* enteropatogênicas (EPEC) produzem uma adesina denominada intimina que está envolvida com a colonização dos enterócitos. Após a adesão, este microorganismo leva a destruição das microvilosidades, atrofia e destruição dos enterócitos. Como consequência, ocorre uma deficiente absorção levando à diarreias em várias espécies de animais e humanos (CARNEIRO et al., 2006). O termo enteropatogênica foi criado para descrever cepas associadas com diarreia infantil. Foi o primeiro grupo de *E. coli* responsabilizado por surto de diarreia de verão, sendo a causa mais comum de diarreia infantil severa em muitos países em desenvolvimento (QUIN et al., 2005).

A lesão característica das infecções causadas pelas EPEC é chamada de "attaching and effacing". Ela pode ser observada em biópsias intestinais de pacientes ou animais infectados, podendo ser reproduzida em culturas celulares. Dentro do grupo da *E. coli* EPEC as bactérias que possuem o plasmídeo EAF são chamadas de EPEC típicas e as que não possuem este plasmídeo são chamadas de EPEC atípicas (KAPER, 1996). O plasmídeo EAF codifica um fator de aderência localizado, denominado "Bundle-forming pili" (BFP), bem como, possui genes importantes para a expressão normal da intimina (NATARO e KAPER, 1998).

Inicialmente a EPEC fixa-se à célula epitelial do intestino delgado através de um pilus formador de feixe (*BfpA*). Essa ligação desencadeia eventos de transdução de sinais, envolvendo a fosforilação de uma proteína principal da célula epitelial Hp-90; ativação da fosforilase C; aumentos do inositol trifosfato (IP₃) e do cálcio, e danos às microvilosidades. No terceiro estágio, a intimina coordena a estreita aderência do micro-organismo, e uma proteína de 39 kDa produz polimerização da actina e de outras proteínas citoesqueléticas do hospedeiro, bem como, rearranjos da estrutura do citoesqueleto. Esse conjunto forma o pedestal característico da EPEC com o micro-organismo intimamente aderente (lesão por fixação e esfacelamento ou "attaching- effacing") (SILVA e SILVA, 2005).

A *E. coli* produtora de toxina Shiga-like (STEC) tem se destacado como causa de colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) no homem. Essa doença tem sido relacionada ao consumo de diferentes tipos de alimentos, destacando-se os produtos e subprodutos de origem bovina. Toxinas Shiga são conhecidas como verotoxinas, verocitotoxinas ou Shiga-like toxinas, são produzidas por alguns patógenos entéricos como a *Shigella dysenteriae* as STEC e as EHEC. A toxina Shiga

contribui substancialmente para o desenvolvimento da CH e é o agente primário causador de complicações como a SHU. A produção de toxina Shiga-like é mediada por fagos lisogênicos os quais codificam a produção de Toxina Shiga 1 (STx1) e Toxina Shiga 2 (STx2), esses fagos representam potenciais elementos genéticos móveis que podem aumentar o possível número de cepas toxigênicas (QUIN et al., 2005).

O isolamento de *E. coli* e *S. aureus* também foi descrito em avestruzes que estavam apresentando conjuntivite e problemas respiratórios na Turquia. De acordo com os autores, após a realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos, as bactérias isoladas apresentaram-se sensíveis a amoxicilina + ácido clavulânico. Todos os animais foram tratados apresentando uma boa recuperação quanto aos sinais clínicos (SAHINDURAN 2004).

No Sul de Portugal, autores relatam a frequência da resistência bacteriana a antibióticos de *E. coli* isoladas de avestruzes. De 54 bactérias isoladas, 9 demonstraram perfil de resistência à ampicilina, 7 à tetraciclina, 3 à estreptomicina, 1 à amoxicilina e ácido clavulânico, cefoxitina ou gentamicina. Cefotaxima, aztreonam, imipenem, ciprofloxacina e sulfa-trimetropim, nenhuma cepa mostrou resistência. Neste estudo também foram encontrados genes de cepas produtoras de betalactamase de espectro ampliado (ESBL) o que reforça os cuidados, pois tais bactérias podem ser transmitidas para humanos (Carneiro et al., 2010)

Ley et al. (2001) descrevem a prevalência de *E. coli* em carcaças de avestruzes em oito abatedouros em Ohio e Indiana (USA). Noventa e um por cento das amostras apresentaram crescimento de *E. coli*. Estas cepas isoladas foram testadas quanto a resistência a antimicrobianos, apresentando 99% resistentes à eritromicina e 65% à neomicina. Já na África do Sul, foi demonstrada a presença de *E. coli* em 18,8% das amostras colhidas após a evisceração de avestruzes destinados à exportação (KARAMA et al., 2003).

Em outras espécies, inclusive em humanos, existem descritos trabalhos relacionados com a presença da bactéria *E. coli* envolvida em diferentes manifestações clínicas. Esmerino et al. (2003) citam a *E. coli* como principal agente bacteriano envolvido em infecções urinárias comunitárias. Neste mesmo estudo, os autores apresentam o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos da *E. coli*. A bactéria apresentou 62,1% de resistência a ampicilina, 43,9% à cefazolina, 22,8% à cefalotina, 3,4% à gentamicina, 14,3% à nitrofurantoína, 5,4% ofloxacina, 7% à amoxicilina + ácido clavulânico, 5,2% à cefotaxima, 20,7% à cefoxitina, 7% à ciprofloxacina, 27,6% à cloranfenicol, 46,6% à tetraciclina e 0% à tobramicina. Também é importante salientar que neste estudo os autores descrevem 3,5% de cepas ESBL.

Em cães, *E. coli* isoladas de infecções do trato urinário, de piometra ou de fezes apresentaram índices de resistência a sulfametoxazole/trimetropim em 61,8% de amostras de fezes, 64,7% das isoladas de infecção do trato urinário e 73,1% de piometra. A ocorrência de *E. coli* resistente a pelo menos três antimicrobianos foi observada em 47,1% de linhagens isoladas de infecção do trato urinário, 13,%% de piometra e 7,3% de fezes (SIQUEIRA et al., 2008).

Dedeić-Liubovic et al. (2009), em um estudo na Bosnia, relatam a frequência e distribuição de cepas de *E. coli* em crianças com diarreia. Neste estudo a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) foi isolada de 54% dos pacientes, seguida de enterotoxigenica (ETEC) 22,3%. Na Itália, também foi descrita a presença de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em fezes de crianças. Neste estudo, os autores relatam que em 46,88% das amostras foram isoladas cepas de *E. coli.*, e em 6,3% das amostras foram detectados genes de patogenicidade (EPEC) (AMISANO et al., 2011)

2.3 *Staphylococcus aureus*

Os *S. aureus* constituem importantes causadores de intoxicações alimentares em humanos e muitas infecções humanas e animais. Em geral, as intoxicações acontecem devido à ingestão de enterotoxinas produzidas pelo crescimento de estafilococos em alimentos ingeridos. O leite *in natura* e os seus derivados, o consumo de carnes, entre outros alimentos, representam uma fonte potencial de *S. aureus* enterotoxigênicos, especialmente no caso de higiene inadequada. Os principais sintomas gerais das toxinfecções alimentares por estas proteínas são vômito e diarreia (LIM et al., 2004).

S. aureus produz uma série de enzimas e exotoxinas que incluem enterotoxinas, TSST-1, toxinas esfoliativas, quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidasas e colagenases, que facilitam a colonização e utilização dos tecidos do hospedeiro para nutrição bacteriana, o que torna este micro-organismo potencialmente patogênico para humanos e animais (ARCHER, 1998; QUIN et al., 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1, produzidas por *S. aureus* fazem parte da família pirotoxinas superantigênicas, juntamente com as exotoxinas secretadas por *Streptococcus pyogenes*, que estão agrupadas por compartilharem muitas características biológicas importantes (DINGES et al., 2000). Cada enterotoxina estafilocócica recebeu a

denominação iniciando pela enterotoxina estafilocócica A, e denominada SEA (do inglês Staphylococcal Enterotoxin A) e assim sucessivamente em ordem crescente do alfabeto (SEA, SEB, SEC, SED, SEE etc.) nas suas características antigênicas (HIRSCH; ZEE, 2003).

A produção de enterotoxinas é regulada por dois mecanismos de “quorum sensing”. O primeiro consiste na auto-indução de uma proteína ativadora de RNAlII (RAP), sua molécula alvo (TRAP). O segundo mecanismo envolve moléculas codificadas pelo locus agr. RAP, são secretadas pelas bactérias normalmente na fase exponencial de multiplicação. Seu peso molecular é de 38 KDa, e a mesma, é responsável pela ativação a síntese de RNAlI e RNAlII forforilando TRAP (proteína alvo de RAP) (KOREM et al., 2003).

O principal mecanismo de defesa do hospedeiro em relação a uma infecção estafilocócica é representado pela fagocitose, pois os estafilococos são bactérias tipicamente extracelulares. Os fatores de virulência produzidos por este micro-organismo interferem principalmente neste mecanismo de defesa e promovem aderência da bactéria às células do hospedeiro, possibilitando o processo de colonização (ARCHER, 1998). A parede celular do *S. aureus* contém a proteína A, que tem habilidade de ligar-se à região FC das moléculas de imunoglobulina G (IgG). A proteína A funciona como um fator de virulência conferindo rigidez à parede celular. Estas atividades incluem habilidade para ativar o sistema complemento e inibição da quimiotaxia de células inflamatórias (MADIGAN et al., 1997), por interferir com a opsonização e desencadeamento da reação de hipersensibilidade dos tipos imediata e tardia (BLACK, 2002).

Os próprios constituintes da parede celular de *S. aureus* (peptidoglicano e ácido teicóico) apresentam atividades biológicas que contribuem para sua virulência, além de conferirem rigidez à parede celular. Estas atividades incluem habilidade para ativar o sistema complemento e inibição da quimiotaxia de células inflamatórias (MADIGAN et al., 1997). A transferência de *S. aureus* resistentes e não resistentes para humanos foi comprovada no meio rural entre criadores de suínos (VAN BELKUM, et al., 2008) e o termo “humanose”, referindo-se como a transferência de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) de humanos para animais de companhia (MORGAN, 2008). A transmissão mecânica de organismos patogênicos é observada também entre insetos, potenciais fontes de contaminação ambiental, especialmente em ambientes hospitalares, de trabalho e residenciais, conforme observado em baratas (TATFENG et al., 2005) e formigas. A transmissão mecânica é verificada em bactérias do gênero *Staphylococcus* (MOREIRA et al., 2005). A transferência de bactérias provenientes dos animais de produção aos agricultores tem sido demonstrada, através do contato ou ingestão (ARMAND-LEFEVRE et al., 2005).

O aumento da resistência aos antimicrobianos tem se tornado um grave problema nas últimas décadas, em que, principalmente as bactérias Gram-positivas têm contribuído de maneira muito significativa para este aumento. Um micro-organismo é resistente a um determinado antimicrobiano, quando ele é capaz de crescer “in vitro” na concentração que esta droga atinge no sangue. O conceito de resistência e sensibilidade está intimamente associado à concentração que o antibiótico ou quimioterápico atinge no principal local de sua ação (TAVARES, 1996).

Existem grupos de pesquisadores tentando elucidar vias de transmissão de genes de resistência entre bactérias. Schauss et al. (2009) relatam em seus estudos os efeitos da sulfadiazina sobre o ecossistema do solo. A aplicação de fezes de animais tratados com antibióticos em solos cultiváveis pode atingir e desequilibrar o meio ambiente. Citam também que um dos efeitos da sulfadiazina sobre diferentes espécies de bactérias é o desenvolvimento de resistência aos antibióticos.

Bactérias resistentes a antibióticos representam uma importante ameaça para o uso com sucesso de antibióticos na medicina humana e veterinária. Antibióticos de uso veterinários utilizados na pecuária contribuem para um aumento da resistência a antibióticos entre bactérias nas fezes. Bactérias portadoras de genes de resistências aos antibióticos, os próprios antibióticos, e seus metabólitos são, inevitavelmente, jogados ao solo quando as fezes são utilizadas como fertilizante. Alguns antibióticos, como a sulfadiazina, são quase completamente excretados e persistem durante o armazenamento das fezes (HEUER et al., 2010). No estado do Rio de Janeiro, foi descrito um clone majoritário de *S. aureus*, com perfil de resistência a vários antibióticos (Aires -de-Sousa, et al., 2007).

Staphylococcus spp. tem sido incriminado como causa de mortalidade embrionária em criatório de avestruzes, foi citado por Janhantigh (2010), além *Bacillus* spp após o isolamento de cem ovos, em propriedade iraniana.

2.4 Utilização de Imunoglobulinas IgY

2.4.1 A IgY

A utilização da imunidade passiva como terapia antimicrobiana é uma prática desenvolvida no século XX. Porém, sua utilização foi deixada de lado, parcialmente, devido a fatores como manifestação clínica nos indivíduos imunizados, o risco de transmissão da doença, a grande variedade de metodologias utilizadas para preparo das substâncias para a imunização e o surgimento de antimicrobianos por volta dos anos 30 (CASADEVALL, 1996). Além disso, a produção convencional de anticorpos requer o uso de laboratórios e uma gama grande de animais como coelhos, suínos ou cavalos e cabras, causando grande estresse nos animais envolvidos (KARLSSON et al., 2004).

A partir de 1980 o uso da IgY foi impulsionada, devido a medidas como a disponibilidade de reativos comerciais (anticorpos secundários) marcados com fluoresceína ou peroxidase, por exemplo. A utilização de anticorpos de gema de ovo (IgY) tem sido uma interessante alternativa substituindo a utilização de anticorpos de mamíferos de maneira tradicional (CHACANA et al., 2004).

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). Aves poedeiras transferem grandes quantidades de imunoglobulina (IgY) para o soro e gemas de seus ovos, o que serve como um meio de proteção passiva ao pinto em desenvolvimento (LEE et al., 2002). A IgY de galinha, também conhecida como IgG de galinha, é o equivalente funcional da IgG das aves, mas difere em muitos aspectos da IgG de mamíferos. A IgY de galinha consiste em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas e tem um peso aproximado de 180.000 kDa. As cadeias pesadas contêm um domínio variável e quatro domínios constantes, com massa molecular de 66 kDa (AKITA e NAKAI, 1993). As cadeias leves, com aproximadamente 22 kDa, apresentam uma região variável e uma região constante. Outros autores descrevem, porém, que a cadeia pesada apresenta 60 kDa e a cadeia leve apresenta 25 kDa (HATTA et al., 1993; POLSON et al., 1985).

Existe uma vasta diferença filogenética entre espécies de aves e mamíferos, assim, uma variação evolucionária mostra que não existe reação cruzada imunológica entre a IgY de galinha e a IgG de mamíferos, por isso as aves são a melhor escolha para a produção de anticorpos contra proteínas de mamíferos. Estes anticorpos não se ligam a receptores Fc de mamíferos e, portanto, não ativam o sistema complemento humano (LARSSON et al., 1992), não reagem com fator reumatóide e nem com anticorpos IgG de humanos anti-camundongo e nem com a proteína A de *Staphylococcus* e G de *Streptococcus* e demonstra pouca reatividade cruzada com a IgG de mamíferos (AKITA e NAKAI, 1993). 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). O isolamento da IgY da gema de ovo é simples e rápido e esta tecnologia pode ser considerada como uma boa alternativa para produção de anticorpos policlonais em aves. Outras vantagens do uso da IgY são o baixo custo da criação, facilidade para coletar ovos sem estressar os animais (TINI et al., 2002). Uma sugestão potencial de uso da IgY na imunoterapia inclui especialmente condições em que, o uso de antibióticos e outras drogas podem ser um problema (AKITA e NAKAI, 1993).

Em avestruzes existem poucos trabalhos descritos na literatura. Cadman et al. (1994) descrevem que o peso molecular da cadeia pesada da IgY extraídas dos soro destas aves apresentam 67,5 kDa e a cadeia leve apresenta 27 kDa. Neste mesmo estudo, os autores afirmam que as imunoglobulinas de avestruzes não foram reconhecidas por anticorpos monoclonais e policlonais contra várias espécies de animais, incluindo, anticorpos contra imunoglobulinas de galinhas. Em outro estudo realizado, com gemas de ovos de avestruzes, os autores descrevem que o peso molecular das cadeias pesadas e leve da IgY, gira em torno de 64 kDa e 28 kDa respectivamente (ADACHI et al., 2008).

2.4.2 Imunização das aves

Existem autores pesquisando outras formas de administração de imunógenos para produção de IgY em galinhas. Mayo et al. (2008) descreveram a produção de IgY com administração oral visando uma alternativa às inoculações via injeções. Neste estudo os autores concluíram que quando comparado com as tradicionais inoculações subcutâneas a inoculação oral pode competir em iguais condições. Amaral et al. (2008) imunizaram 6 aves com uma suspensão bacteriana contendo antígenos oriundos de *E. coli* EPEC, 3 aves foram imunizadas por via intramuscular e 3 por via intravenosa, sendo obtido aumento da titulação de anticorpos por ambas as vias. Após a terceira imunização houve titulação maior por via IV em comparação com a titulação pela via IM. Em avestruzes, Adachi et al. (2008) descrevem a imunização via intra-muscular na região lombar das aves. Neste estudo, os autores citam a administração de 30 a 50 µg/ave de hemaglutinina (HÁ) do vírus H5N1 emulsificada em Ajuvante Completo de Freund's. Os resultados encontrados sugerem que a dose administrada foi suficiente para alcançar altos títulos contra HA no soro e na gema das aves.

Chalghoumi et al. (2008) relatam a produção de IgY em galinha utilizando antígenos de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* simultaneamente. Ao mesmo tempo, os autores testaram dois tipos diferentes de adjuvantes: o Adjuvante de Freund's (FA) e a matriz imunoestimulante (IM). Neste estudo, os autores concluem que houve um aumento nos níveis de IgY com as duas sorovares de *Salmonella* no mesmo ovo utilizando FA. Por outro lado, os animais que foram inoculados utilizando o adjuvante (IM) tiveram menor resposta na formação de IgY.

2.4.3 Extração da IgY dos ovos

Existem diferentes métodos de precipitação e cromatográficos para extração da IgY a partir da gema de ovo. Entre eles estão os métodos de precipitação por sulfato de amônio ou de sódio, polietilenoglicol (PEG), ácido caprílico. A concentração frente a estes diferentes métodos varia entre 10 e 20mg/mL, podendo-se encontrar 100 a 400 mg de IgY por ovo, variação que depende de fatores como a raça da ave, o tamanho do ovo e as variações fisiológicas individuais (AKITA e NAKAI 1993; MCLAREN et al., 1994; CHACANA et al., 2004).

Já em outras aves como codornas, a purificação de IgY a partir de gema de ovos apresentou em média 7.467,5 µg/mL. Esta IgY, quando dissociada apresentou bandas de 25 e 65 kDa para as cadeias leves e pesadas, respectivamente, através de SDS-PAGE (OLIVEIRA et al., 2010). Em avestruzes Adachi et al. (2008), afirmam que é possível a obtenção de até 200 g de IgY contra vírus da Influenza de uma única fêmea durante um ano.

Akita e Nakai (1993), compararam quatro métodos de produção de IgY de galinhas imunizadas. Concluíram que o método de diluição em água, pH 5.0, com repouso a 4°C ou centrifugação, seguido de precipitação com sulfato de sódio, ultrafiltração ou álcool precipitação, ou precipitação com sulfato de sódio, e finalmente, gel filtração/troca iônica, seria o melhor método em termos de produção em larga escala.

Quanto à estabilidade, a IgY é mais sensível que a IgG de coelho, por exemplo, a desnaturação ácida, pode perder completamente sua atividade específica como anticorpo. A IgY perde completamente sua atividade quando exposta a um pH 3 ou 4 (SHIMIZU et al., 1992). Neste sentido, existem alguns estudos na tentativa de proteger a IgY durante a passagem pelo compartimento gástrico. Kovacs-Nolan e Mine (2005), utilizaram um sistema

de microencapsulação com um polímero de ácido metacrílico com resultados satisfatórios na proteção da IgY. Utilizando suínos como modelo, a IgY permaneceu com atividade maior que a IgY não encapsulada.

2.4.4 Utilização terapêutica e profilática da IgY

2.4.4.1 Em animais de produção

Na literatura, encontramos várias pesquisas que demonstram a eficácia da utilização de IgY em animais.

Yokoyama et al. (1998), utilizando anticorpos específicos contra *Salmonella typhimurium* ou *S. dublin*, verificaram que foi possível prevenir salmonelose em bezerros do nascimento até duas primeiras semanas de vida, após administração da gema aos animais com concentrações de anticorpos suficientes para neutralização do patógeno e seus metabólitos.

Kweon et al. (2000), por exemplo, relatam a utilização profilática de IgY de ovo de galinha sobre o Vírus da Diarréia Epidêmica de Suínos (PEDV), com os animais que receberam 2 a 4 mg/ml de IgY por dia e isolados e alimentados separadamente para posterior inoculação do vírus. Os resultados do trabalho mostraram-se promissores, uma vez, que a taxa de sobreviventes aumentou quando comparada aos controles. Em outro experimento, utilizando leitões e bezerros, estes, foram tratados com IgY específicos contra doenças entéricas causadas por cepas de *E. coli* (K88, K99, 987P). Tais resultados foram constatados em experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* (MINE e KOVACS-NOLAN, 2002).

Ribeiro et al. (2005, 2007), descrevem o fornecimento de gema de ovos de galinha hiperimunizadas contra *E. coli* patogênica para suínos e avaliam a imunidade passiva de leitões recém-nascidos. Os resultados deste estudo sugerem que o uso de gemas de aves hiperimunizadas contra *E. coli* age efetivamente na prevenção da diarréia dos leitões e seu uso contínuo é mais vantajoso que o fornecimento somente ao nascer. Malik et al. (2006) no Paquistão descrevem a utilização de IgY purificada como imunização passiva contra a infecção pela doença de Gumboro em galinhas. A administração de IgY em aves infectadas resultou em 92% de recuperação das mesmas, quando comparada com o grupo controle. Demonstrando, portanto que o uso de IgY purificado pode ser utilizado como uma ferramenta

terapêutica no tratamento da doença de Gumboro em aves infectadas. Em outro estudo conduzido por Mahdavi et al. (2010), galinhas foram suplementadas com IgY produzidas contra *E. coli* O78:K80 e então avaliadas de acordo com sua performance de crescimento. As galinhas apresentaram uma maior conversão alimentar nos lotes onde as aves foram suplementadas com 0,2% de IgY por 3 semanas.

Marquardt et al. (1999), induziram diarreia em leitões de 3 a 21 dias de vida e em leitões recém-desmamados, utilizando a cepa K88+ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) e os resultados obtidos demonstraram que 24h após o tratamento com gemas contendo anticorpos anti-K88+, a diarreia foi curada, ao passo que, os animais tratados com gema em pó de galinhas não imunizadas continuaram com diarreia, havendo morte de 62% destes devido a diarreia severa.

Zhen et al. (2008), testaram a eficácia de IgY em bovinos com mastite causada por *S. aureus*. Neste estudo, os autores utilizaram 18 vacas em lactação com mastite clínica e 18 vacas com mastite experimental. Foram inoculados 20 mg/ml por infusão de IgY em um dos quartos de maneira aleatória. Em outro quarto, foi inoculado 100mg/ml de penicilina. Os resultados foram avaliados após 6 dias da infusão através de cor, consistência, contagem de células somáticas e contagem bacteriana. Os resultados demonstraram que na maioria dos animais tratados a coloração e consistência voltaram ao normal durante o tratamento. A contagem de células somáticas e contagem bacteriana decresceram quando comparados com o grupo controle, embora tenham continuados altos. A taxa de cura utilizando IgY foi de 83,3% nas vacas com mastite experimental e de 50% nas vacas com mastite clínica. Resultados demonstraram a IgY, neste caso, com grande potencial como terapêutica em mastites causadas por *S. aureus*. No ano seguinte estes mesmos autores citam a atividade in vitro da IgY sobre *E. coli* causador de mastite em bovinos. A inibição no crescimento de bactérias isoladas de vacas com mastite apresentou-se, específica e efetiva, na concentração de 20 mg/mL (ZHEN et al., 2009). Sunwoo et al. (2002) descrevem a habilidade de inibição da IgY de galinha sobre a *E. coli* O157:H7. Neste estudo, os autores explicam que a função antibacteriana da IgY parece resultar da interação da mesma com componentes da superfície da bactéria, comprovada através de imunofluorescência e microscopia eletrônica.

A inibição do crescimento in vitro de *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis* após cultivo concomitante dos mesmos com os anticorpos IgY específicos foi verificada. A taxa de crescimento destes dois micro-organismos, quando incubadas com IgY específicos, foi considerada quatro vezes menor durante 4 a 6 h de incubação em comparação com o grupo controle (Lee et al., 2002).

Guimarães et al. (2009), afirmam que, a inibição do crescimento de *S. aureus* foi eficiente quando utilizadas IgYs específicas nas concentrações de 1-5 µg/ml. Segundo os autores, a função bacteriostática da IgY é devido a interação da mesma com componentes da superfície do *S. aureus*.

A utilização de IgY extraídas de ovos de avestruzes foi descrita recentemente. Pesquisadores Japoneses produziram anticorpos IgY contra a hemaglutinina do vírus H5N1. Utilizando filtros impregnados com anticorpos IgY anti H5N1, os autores relatam que houve inibição na transmissão do vírus para as galinhas utilizadas no experimento (KAMIYAMA et al., 2011).

2.4.4.2 Em outras espécies de animais

Nguyen et al. (2006), relatam o efeito protetor de imunoglobulinas derivadas de gemas de ovos de galinhas (IgY) contra o Canine parvovirus 2 (CPV-2). Demonstrando uma redução satisfatória na apresentação dos sinais clínicos da parvovirose nos cães amostrados.

Na China, Xiao-liang et al. (2006) produziram IgY contra *Aeromonas hydrophila* em ovos galinhas White Leghorn para a utilização em peixes. Em cada peixe utilizado no experimento foram inoculados 0,25 ml de 30 mg/ml de IgY específica contra *Aeromonas hydrophila*. Os resultados demonstraram uma taxa de proteção em peixes *Carassius auratus Gibelio* (carpas) em 60% contra infecção pelo microorganismo e definindo, portanto, como uma nova alternativa de tratamento.

Lu et al. (2008), utilizaram em um experimento IgY de galinha derivada de vírus da “White spot syndrome vírus” (WSSV) inativado ou a de uma vacina de DNA de WSSV. Este vírus foi considerado um dos grandes causadores de perdas em camarões. Os camarões foram inoculados com 250 mg/ml de IgY. Após a inoculação, foram analisados os percentuais de sobrevivência. Os resultados mostraram que, 73,3% dos camarões inoculados com IgY produzidos com WSSV inativado sobreviveram. Por outro lado, os camarões que foram inoculados com IgY produzidos com vacina de DNA do WSSV, apresentaram 33,3% de sobrevivência.

2.4.4.3 Em Medicina humana

Neste sentido também existem citados na literatura, trabalhos importantes relativos à utilização terapêutica e profilática da IgY.

Almeida et al. (1998), por exemplo, relatam a utilização de IgY produzida em galinhas contra veneno de cobras do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. As imunoglobulinas produzidas e purificadas foram capazes de bloquear a atividade hemolítica de ambos os venenos das cobras citadas e também neutralizou a atividade tóxica letal do veneno com boa eficácia.

Smith et al. (2001), em um de seus estudos demonstra a atividade de IgY anti *Streptococcus mutans* na proteção da cárie em ratos. Este estudo deixa claro que, a IgY tem efeito protetor contra a infecção do *S.mutans*.

Kollberg et al. (2003), estudaram os benefícios profiláticos da IgY administrados, via oral, em pacientes com fibrose cística. Tal estudo, objetivou controlar ou diminuir a infecção destes pacientes pela *Pseudomonas aeruginosa*. Neste estudo, a imunoterapia oral com IgY sugeriu que o tempo foi prolongado entre a primeira e a seguinte colonização pela *Pseudomonas aeruginosa*. A infecção crônica com *Pseudomonas aeruginosa* decresceu em indivíduos tratados. Nenhum dos pacientes tratados de maneira prolongada com IgY desenvolveu infecção crônica. A taxa de colonização intermitente diminuiu e conseqüentemente, a necessidade de tratamento com antibiótico também foi diminuída.

Horie et al. (2004), utilizaram para suprimir a infecção pelo *Helicobacter pylori* em humanos, uma bebida láctea (yogurt) contendo IgY específica. Foi utilizada a IgY chamada de IgY-urease que demonstrou estabilidade maior até os 7 dias e decresceu em torno de 85%, após três semanas de estocagem. Foram utilizados voluntários positivos para *H. pylorri*. Foram fornecidas porções de 15 ml, por três vezes ao dia, por 4 semanas. Após 2 a 4 semanas, os resultados mostraram uma supressão na infecção pelo *H. pylori* em humanos que receberam a IgY-urease positiva em “yogurt”.

Paul et al. (2007), desenvolveram IgY em galinha imunizadas com veneno da cobra *Echis carinatus*. O objetivo do trabalho foi de produzir um antiveneno monovalente como alternativa ao soro polivalente antiveneno convencional produzido em eqüinos. Seus resultados, apesar de promissores, sugerem futuros estudos para confirmar a eficácia da utilização em vítimas de picadas de cobras.

Almeida et al. (2003), descrevem a utilização de IgY anti BfpA como uma alternativa na utilização de imunobiológicos para o reconhecimento da presença de EPEC em fezes humanas. Vieira-da-Motta et al. (2001), desenvolveram IgY anti-enterotoxina C e D em

galinhas White Legorn, que apresentaram efeito inibitório no crescimento de *S. aureus* de origem bovina e cepas- padrão de origem humana, bem como, efeito anti-proliferativo de linfócitos T *in vitro*.

Yokoyama et al. (2007), relatam o efeito da IgY sobre a bactéria *Porphyromonas gingivalis gingipains* em pacientes, com periodontites. A IgY anti *P. gingivalis* (30- 60 mg) foi aplicada em forma de gel na gengiva de pacientes onde foi isolada tal bactéria. Neste estudo, foi demonstrado um decréscimo nos níveis de *P. gingivalis* no grupo tratado demonstrando a eficácia da IgY utilizada em pacientes com periodontite.

Em outro estudo, Wang et al. (2008), mensuraram a capacidade de inibição *in vitro* de IgY de galinha sobre *Candida albicans*. A concentração de IgY que inibiu efetivamente o desenvolvimento da levedura ficou entre 1,25 g/l e 5,0 g/l, com taxa de eficiência de 82,98%.

Amaral et al. (2008), verificaram, em seu trabalho que, a IgY produzida em galinhas inoculando EPEC 0111, STEC 0111 E STEC 0157 teria habilidade “*in vitro*” e atividade biológica sobre estas três cepas bacterianas. Seus resultados mostraram-se efetivos quanto à atividade biológica “*in vitro*”, reforçando a alternativa de uso profilático ou tratamento destes micro-organismos com a IgY produzida.

Criste et al. (2008), relatam a produção de IgY em patos utilizando veneno de *Vipera ammodytes na Vipera berus*. Os resultados deste estudo demonstraram uma boa resposta imunológica com este tipo de imunização com IgY, de boa qualidade, de baixo custo e com grande sobrevivência dos patos inoculados que receberam o veneno.

Wang et al. (2010), demonstraram a facilidade de uso IgY gema de ovo como uma intervenção terapêutica em casos de intoxicação por E. Coli O157: H7, produtora de Shiga toxina. Neste estudo, a proteína da subunidade B da toxina Shiga tipo 1 (Stx1) foi utilizada como imunógeno para a imunização de galinhas poedeiras para a produção de IgY. O efeito protetor da IgY contra Stx1 foi avaliado *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrado que a IgY anti-Stx1 poderia, efetivamente, bloquear a ligação do Stx1 às células Hela e poderia proteger camundongos BALB / c de desafios contra a toxina.

Ma e Zhang (2010), descrevem a produção de IgY anti lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas em galinhas. Neste estudo, a IgY diminuiu a mortalidade dos camundongos desafiados com LPS, fornecendo segundo os autores, uma maneira eficiente de produzir anticorpos em ovos atenuando os efeitos letais de LPS.

de Paula et al. (2011), descrevem a produção de anticorpos IgY policlonais contra o vírus da hepatite A (HAV). Neste estudo, a atividade específica da IgY produzida foi testada

usando ELISA, Western blot e ensaios in vitro. Os resultados sugerem que a gema de ovo pode ser uma fonte de grande escala de anticorpos específicos contra o vírus da hepatite A.

2.4.4.5 Utilização da IgY como ferramenta para imunodiagnóstico

Nas últimas décadas, houve uma busca incessante de métodos analíticos com elevada especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade conferindo uma eficácia muito grande em diagnósticos tanto da área humana quanto animal.

Neste sentido, alguns pesquisadores tem vislumbrado a utilização de IgY como uma ferramenta barata e conveniente também para o uso em imunodiagnósticos.

Freire et al. (2004), por exemplo, descrevem a elaboração de um ensaio imunoenzimático (ELISA de captura) com anticorpos IgY para a detecção e quantificação de acetato de Lupeol em *Vernonia scorpiooides Lam Pers (Asteraceae)*. A eficácia da metodologia foi de 99% de sensibilidade e de 95% de especificidade para detecção do acetato de lupeol.

Na busca da elucidação sobre reações cruzadas entre anticorpos de galinhas disponíveis no mercado e outras espécies de aves, um grupo de pesquisadores realizou uma importante pesquisa. Cray e Villar (2008) determinaram a reação cruzada entre anti-chicken disponível comercialmente para diagnóstico em diferentes espécies de aves. Utilizando a "Western blot", o plasma de diferentes espécies de aves foi testado. Os resultados mostraram que alguns kits comerciais de anti-chicken IgY apresentam uma boa reatividade cruzada entre muitas espécies de aves.

Tsen et al. (2003), avaliaram o uso de IgY produzida em marreco de Pekin na produção de um kit baseado na aglutinação de micropartículas de poliestireno. O kit produzido para diagnóstico da proteína C reativa que é considerada umas das marcadoras de problemas cardíacos. O estudo demonstrou que a IgY produzida em pato, neste estudo, é comparável com a produzida em mamíferos. Portanto, sugerida para ser utilizada não somente para este propósito, como também para outras aplicações em diagnóstico.

Brunda et al. (2006), com o objetivo de detecção de veneno de cobra (*Naja naja naja*) em amostras oriundas de estudo forense, desenvolveram um teste de ELISA com a utilização de IgY de galinha. Os autores concluíram que a metodologia pode ser utilizada com objetivo de detectar vítimas de veneno de cobra em laboratórios forenses.

Lee et al. (2005), desenvolveram também um teste de ELISA de captura para detecção de interleucina-6 (IL-6) que é um marcador de doenças. Neste estudo, o teste foi capaz de detectar até 10ng/ml de rpIL-6 do soro de suínos. Portanto, sendo considerado com correlação direta com o estado de saúde dos suínos alojados em fazendas.

3 OBJETIVOS

1 - Desenvolver e avaliar a ação de anticorpos IgY, produzidos em avestruzes imunizados contra proteínas recombinantes provenientes de *E. coli* e *S. aureus*.

2 - Produzir anticorpos anti-avestruz, através da inoculação de IgY em coelhos e cabra.

3 - Isolar, caracterizar por PCR cepas de EPEC e investigar o perfil de cepas de *E. coli*, frente a antibióticos e também, isolar e caracterizar o perfil de cepas de *S. aureus*, frente a antibióticos, de amostras de fezes de avestruzes, em criações dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo.

4 JUSTIFICATIVA

A produção de anticorpos IgY em avestruzes imunizadas, com antígenos recombinantes, trata-se de tema inédito. Este, poderá fornecer novas informações sobre a qualidade e quantidade destes 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 avestruzes no Brasil, é imprescindível o esclarecimento dos principais microorganismos que compõem a microbiota intestinal destes animais e sua resistência às drogas, em especial as bactérias *E. coli* e *S. aureus* que podem representar risco à saúde de humanos. Além disso, a mortalidade de avestruzes na fase inicial de crescimento envolve os patógenos investigados, podendo desta forma, ser feito um acompanhamento das mães hiperimunizadas e de seus produtos quanto à ocorrência de doenças.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho foram obedecidos todos os procedimentos experimentais dentro dos padrões éticos e de acordo com as leis de proteção de animais. O projeto foi aprovado pela comissão de ética de uso de animais (CEUA-UENF) sob nº de protocolo nº 034, em 11 de novembro de 2008.

5.1 Desenvolvimento e avaliação da ação de anticorpos IgY produzidos em avestruzes imunizados contra proteínas recombinantes provenientes de *S. aureus* e *E. coli*.

5.1.1 Imunização das aves

Nesta etapa, foram utilizadas um total de quatro fêmeas, em reprodução, pesando entre 100 e 150 Kg para acompanhamento e desenvolvimento de anticorpos. As aves utilizadas pertencem à fazenda de criação de avestruzes, denominada “Estação do Avestruz”, localizada no município de Saquarema, no estado do Rio de Janeiro.

Amostras contendo adjuvante completo de Freund (AFC) e concentração conhecida de proteínas recombinantes (200 µg por imunização) derivadas de *E.coli* e *S. aureus* foram injetadas, via intramuscular, no músculo braquial, na região da asa das aves (Anexo 1 A e B), em intervalos de 21 dias, perfazendo um total de três imunizações (Tabela 1). As proteínas/antígenos selecionadas para imunização foram: enterotoxina C estafilocócica recombinante SEC_{rec} e RAP_{rec}, envolvidas na patogenicidade de *S. aureus* e proteínas recombinantes EspB_{rec} e BfpA_{rec}, (FLORES et al., 2002) envolvidas em patogenicidade de *E. coli*, todas produzidas no Laboratório de Biotecnologia/CBB/UENF.

Tabela 1 – Etapas de imunização dos avestruzes com proteínas recombinantes SEC_{rec} e RAP_{rec} e EspB_{rec} e BfpA_{rec} para obtenção de IgY.

Ave	1 ^a Inoculação	2 ^a Inoculação	3 ^a Inoculação	Antígeno
ML 05	Dia 0	Dia 21	Dia 42	BfpA _{rec}
GA 03	Dia 0	Dia 21	Dia 42	RAP _{rec}
EQ 27	Dia 0	Dia 21	Dia 42	EspB _{rec}
EQ 17	Dia 0	Dia 21	Dia 42	SEC _{rec}

5.1.2 Colheita de sangue

Das fêmeas utilizadas no experimento foram colhidas amostras de sangue, antes e depois das etapas de imunização, conforme tabela 1 no item 5.1.1 A última amostra de sangue foi colhida 15 dias após a última inoculação.

As amostras de sangue das aves foram colhidas utilizando-se tubos de “vacuntainer”, por punção da veia jugular ou veia braquial (Anexo 2). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas sob refrigeração e transportadas ao Laboratório de Sanidade Animal da UENF. No laboratório, as amostras foram centrifugadas e o soro obtido, foi acondicionado em tubos plásticos de 2,0 ml. Posteriormente, o soro foi armazenado em freezer -20° C, até ser processado.

5.1.3 Colheita de ovos

De cada fêmea, foram colhidos: um ovo antes e um ovo depois das imunizações, conforme tabela 1 no item 5.1.1

5.1.4 Purificação de anticorpos IgY de gemas das avestruzes inoculadas

O protocolo para purificação de IgY, de gemas de ovos de avestruzes, foi uma adaptação daquele, utilizado por Vieira-da-Motta et al. (2001) em gema de ovos de galinha. As gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com PBS, pH 7.2 (Anexo 3 A e

B). O seu conteúdo 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 e deixadas em repouso por 16h a 4°C. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 xg por 30 min a 4° C. Ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de sódio ou Sulfato de Amônia (Merck, Alemanha), sob agitação, em quantidade suficiente para atingir 19 ou 20 % de saturação, respectivamente (p/v). A solução foi mantida em temperatura ambiente, sob agitação, por 2h e centrifugadas a 10.000 xg por 30 min. As soluções purificadas da gema contendo IgY, após concentradas, passaram por diálises contra PBS, e em seguida, submetidas à filtração (0,22µm). Posteriormente, as amostras foram aliquotadas e congeladas a -20°C.

5.1.5 Quantificação de proteínas

Foi realizada através de dosagem pelo método do ácido biscinconínico (BCA™; Sigma, EUA). Como proteína referência (padrão) foi utilizada a soroalbumina bovina (BSA, Sigma, EUA) diluída na mesma proporção e comparada com o material testado. Foi realizada a seguir, uma curva de calibração de proteína padrão com BSA a 1mg/mL em 6 poços com duplicata, possuindo, respectivamente, 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL do BSA em 10, 8, 6, 4, 2, 0 µL de PBS, acrescentando 200 µL do reagente, na proporção de 50 partes de ácido biscinconínico para uma parte de sulfato de cobre II penta-hidratado. As amostras foram diluídas 1:100 e transferidas num volume de 10 µl, em poços duplicados. Por último, foram adicionados 200 µl aos poços da placa contendo o reagente ácido biscinconínico com sulfato de cobre II penta-hidratado. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos, sendo posteriormente, lida em espectrofotômetro em 570 nm.

5.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras obtidas, resultante do processo de purificação das proteínas foram submetidos à análise eletroforética em SDS-PAGE.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em sistema descontínuo (Bio Rad Mini Protean II, USA), constituído de gel separador a 15% de acrilamida, gel de empilhamento a 4% de acrilamida e tampão de corrida Tris-Glicina, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras foram preparadas em tampão de amostra, fervidas por 5 minutos, aplicadas no gel em volumes de 10µl por canaleta, e submetidas à uma corrente inicial de 100V/60mA por 50 a 60 min. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie R250 (Gibco BRL, EUA) a 0,1% em solução metanol-acético, sob agitação lenta, por 30 a 40 minutos, e depois descorado com uma solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético, até a visualização das bandas.

5.1.7 ELISA para avaliação dos anticorpos no soro das fêmeas inoculadas com proteínas recombinantes

Os soros foram titulados pelo método de ELISA. A sensibilização da placa foi feita com solução de cada proteína recombinante e inoculada na concentração de 1 a 2µg/ml em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6, e incubação a 37⁰ C por 2 h. Após 1 lavagem com PBS, contendo 0,05% de tween 20 (PBST), a placa foi bloqueada com gelatina 1%, diluída em PBST (PBSTG), deixando 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas três lavagens da placa com PBST. Os poços foram, então preenchidos com 100 µl dos respectivos soros, diluídos em PBSTG, nas proporções de 1:1.000 até 1:2.187.000, seguido de incubação a 37⁰C, por 45 minutos. Em seguida, foram feitas três lavagens da placa com PBST e então adicionado de 50 µl do anticorpo anti-avestruz (cabra 1:4000, coelho 1:2000 e galinha 1:2000) diluído em PBS e novamente incubação a 37⁰C por 45 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, a placa foi lavada com PBST por três vezes. Em seguida, foi adicionado em cada poço, 50 µl de avidina, marcada com peroxidase na diluição de 1:1000 e a placa, então, incubada por 1 hora. Após 4 lavagens com PBST, a reação foi revelada pela adição de 50 µl de substrato enzimático, (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 µl de água oxigenada 30V e 5 mg de orto-fenildiamina (OPD). Após esse processo, a placa foi incubada por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl de H₂SO₄ 3N, sendo a placa lida em espectrofotômetro a 492 nm.

5.1.8 Western blot

As proteínas foram analisadas, através da técnica de “Western blot”, utilizando anticorpos específicos. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi montado em placas de mini gel, com 8,3 cm de largura e 5,3 cm de altura (Mini-Protean II). O gel foi constituído de dois tipos: um denominado de stacking gel e o outro de gel de separação. O gel stacking foi composto de 1,0 ml de água deionizada, 300 µl de solução de acrilamida/bisacrilamida 30%, 4 µl de stacking gel 4x, 28 µl de persulfato de amônia a 10% e 5 µl de TEMED. O gel de separação das proteínas foi composto de 3,7 ml de água deionizada, 1,8 ml de solução de acrilamida 30%, 1,9 ml de tampão de separação 4x, 112 µl de persulfato de amônia a 10% e 5 µl de TEMED. As voltagens utilizadas para eletroforese foram de 70 V, durante a migração no stacking gel e de 100 V, durante a migração das proteínas no gel de separação. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose a 10V/por duas horas em sistema Mini Trans Blot (Bio-Rad), contendo tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol, 3,7% SDS). Após a transferência, a membrana foi corada com a solução Ponceau (0.1% p/v de Ponceau, 5% de ácido acético, diluída 5 vezes em água) de forma a confirmar a eficiência da transferência das proteínas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com TST 20 e leite a 1% p/v overnight sob agitação de 4 a 8°C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (soro das avestruzes) na diluição de 1:1.000 em TST 20 leite 0,3% durante duas horas sob agitação em T°C ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada por três vezes, cada uma durante 5 minutos com TST 20, e incubada, com o anticorpo secundário na diluição de 1:2.000, durante 2 horas, sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi novamente lavada por três vezes, cada uma durante 5 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com Avidina, marcada com peroxidase na diluição de 1:500 em TST 20 +0,3% de leite por 2 horas, sob agitação em temperatura ambiente. Após mais três lavagens da membrana, cada uma de 05 minutos, a reação foi revelada com uma solução contendo Tris HCl 1 M pH 7,4, 100 mM de imidazol, água oxigenada, água destilada e DAB (3, 3' diaminobenzidina).

5.1.9 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti SEC_{rec}, RAP_{rec} e EspB_{rec} e BfPA_{rec}, sobre o crescimento de cepas de *S. aureus* e *E. coli*

Para a avaliação da atividade de anticorpos IgY anti SEC_{rec}, RAP_{rec}, foram utilizadas cinco cepas de *S. aureus* (ATCC 25923, LSA88, FRI361, Saost1 e Saost2) e cinco cepas de *E. coli* (EPEC (E2348/69), EAEC (O42), ETEC (H10407), EIEC (EDL1284), EHEC (EDL931) e ATCC 25922). As cepas FRI361 e LSA88 correspondem às amostras clínica humana e clínica bovina, respectivamente, e são produtoras de enterotoxina C pertencentes ao acervo do LSA. As cepas Saost1 e Saost2 são provenientes de animais utilizados nestes experimentos. As cepas de *E. coli* foram gentilmente cedidas pela Dra. Kátia Aranda, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo. A partir de estoque congelado a -20°C, estas células foram inoculadas em 5 ml de caldo BHI, em tubos tipo Corning de polipropileno de 50 ml e incubados durante 16 horas, a 37°C em agitação constante, em estufa bacteriológica (200 rpm). A partir desse inóculo foram preparadas amostras em solução salina contendo aproximadamente 10⁸ células/ml (DO = 0,5). As células foram incubadas em triplicata com 50 µl (1,8 µg/ml) de IgY pré ou pós inoculações anti SEC_{rec} ou RAP_{rec} para cepas de *S. aureus* e anti EspB_{rec} and BfpA_{rec} para *E. coli* em caldo BHI, a 37°C, por 4 horas em agitação constante. Os cultivos foram lidos, utilizando um fotômetro (Densimat, bioMerieux, França) antes e depois de cada etapa de incubação, para avaliar o efeito de IgY sobre o crescimento bacteriano nos diferentes tratamentos. Após a leitura, as bactérias tratadas com IgY anti SEC_{rec}, ou RAP_{rec} para cepas de *S. aureus* e anti EspB_{rec} and BfpA_{rec} para *E. coli*, foram inoculadas em agar PCA e Agar McConkey, para análise da inibição em meio de cultura.

5.1.9.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de Tukey (p<0,05). O software utilizado para as análises foi o Statistical Package for the social Sciences (SPSS 15.0).

5.2 Produção e avaliação de anticorpos anti-avestruz através da inoculação de IgY purificada em coelhos e cabras

5.2.1 Purificação de anticorpos IgY utilizando kit com coluna de afinidade HiTrap™ IgY (GE)

Nesta etapa, uma solução de gema colhida de gema de fêmea de avestruz adulta purificada, conforme item 5.1.4, foi submetida a mais uma etapa de purificação, utilizando um kit específico para purificação de IgY.

Após a IgY ser extraída e purificada pelo método descrito anteriormente, a solução foi submetida a purificação com coluna de afinidade (HiTrap™ IgY- GE) com capacidade para 5 ml e capacidade de ligação de até 100 mg de IgY pura. Inicialmente, a coluna foi preparada e lavada com 25 ml de tampão Fosfato de sódio 20 mM com 0,5 M de Sulfato de Potássio, pH 7,5 (tampão de ligação) após com tampão de Fosfato de sódio 20mM pH 7,5 (tampão de eluição) e finalmente com tampão Fosfato de sódio 20mM, com 30% de isopropanol, pH 7,5 (tampão de lavagem). A coluna foi equilibrada com 25 ml de de tampão de ligação e a amostra foi aplicada utilizando bomba de vácuo. Em seguida, a coluna foi lavada com 50 ml de tampão de ligação e finalmente feita a eluição com 50 ml de tampão eluição. As amostras foram colhidas durante a eluição, em aliquotas de 1ml e posteriormente acondicionada a -20°C até o seguinte processamento. As proteínas foram quantificadas pelo método do ácido biscinconínico, conforme item 5.1.5.

5.2.2 Imunização dos animais com IgY purificada para produção de anti-IgY

Nesta etapa, foram utilizados três coelhos adultos e uma cabra, mestiços, pesando em média aproximadamente 3 kg e 45 kg, respectivamente. Os animais foram adquiridos de fornecedores na cidade de Vila Velha-ES, e durante o experimento receberam ração própria da espécie e água “*ad libitum*”. Todos os animais utilizados neste trabalho foram mantidos, tratados e manuseados, conforme as normas éticas internacionais que regulam o uso de animais em experimentação (REMFY, 1987).

O material utilizado para as imunizações em coelhos e cabra correspondeu às alíquotas mais puras obtidas pelo processo de extração por cromatografia de afinidade (alíquotas 8, 9, 10, 11 e 12, mostradas nas figuras 45 e 46). Inicialmente, uma suspensão contendo 0,5 mg/ml de IgY foi emulsionada com adjuvante completo de Freund (ACF) (vol/vol) e inoculada 0,5 ml por via intramuscular, na região da coxa, em cada animal (Anexo 4 A e B) . Vinte e um dias após, foi realizado o primeiro reforço, utilizando a mesma dose, por via intradérmica na região dorsal, porém com adjuvante incompleto de Freund (AFI). Após um intervalo de 14 dias, foi inoculada a terceira dose, novamente 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 7 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 colhido sangue antes de cada inoculação (Tabela 2) e quinze dias após a última inoculação, o sangue foi colhido via jugular e os soros armazenados a -20°C até o seu processamento.

Tabela 2 – Etapas de imunização em cabra e coelhos utilizados para produção de anticorpos anti-IgY.

Dia (s)	Dose/animal
0	0,5 mg/ml de IgY em ACF
21	0,5 mg/ml de IgY em AFI
35	2 mg/ml IgY em salina
42	2 mg/ml IgY em salina
49	2 mg/ml IgY salina
56	2 mg/ml IgY salina

5.2.3 Titulação dos soros dos coelhos e cabra através do teste de ELISA

A sensibilização da placa para o teste de ELISA foi feita com solução de proteína purificada de IgY na concentração de 1 a 2µg/ml em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6. Após incubação a 37⁰C, por 2 h, foi feitas três lavagens com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST). Em seguida, foi feito bloqueio com gelatina 1% diluída em PBST (PBSTG), deixando 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, novamente foram

feitas três lavagens com PBST, e os poços foram preenchidos com 100 µl dos respectivos soros, e então, diluídas em PBSTG iniciando com 1:500 até 1:1.093500. Após, a placa foi incubada a 37⁰C, por 45 minutos e lavadas três vezes com PBST. O passo seguinte consistiu na adição de 50 µl do anticorpo anti-coelho ou anti-cabra (Sigma, EUA) conjugados a peroxidase diluído 1:1.000 em PBS e incubação a 37⁰C, por 45 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, a placa foi lavada com PBST, sendo a reação revelada pela adição de 50 µl de substrato enzimático (6,5 ml de ácido cítrico 0,1 M, 7,0 ml de fosfato de sódio 0,2 M e 11,55 ml da diluição 1:1150 de água oxigenada 30V em água destilada), acrescido de uma substância cromógena, orto-fenildiamina (OPD), incubando por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl de H₂SO₄ 3 N, sendo a placa lida em espectrofotômetro a 492 nm.

5.2.4 Purificação do soro hiperimune (IgG) de coelhos e cabra utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia

O protocolo para purificação de IgY do soro de coelhos e cabra, utilizando ácido caprílico, foi uma adaptação daquele utilizado por Russ et al. (1983). O soro (10 ml) foi diluído 1:3 em tampão acetato de Sódio pH 4,0 e o pH da solução foi ajustada para 4,5. A seguir, foi adicionado ácido caprílico (coelho 0,75 ml/10 ml e na cabra 0,7 ml/10 ml de soro) lentamente, sob agitação por 30 minutos, em temperatura ambiente, e subsequente centrifugação a 10.000 g por 30 minutos, a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi colhido e o pH ajustado para 7,0 com NaOH 1 M. Após, o sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 g/20 minutos. O sobrenadante desta fase foi precipitado lentamente, sob agitação com sulfato de amônio até 45% p/v, deixando 30 minutos a T°C ambiente e centrifugado a 5.000 g por 15 minutos. Após, o mesmo foi descartado e o precipitado dissolvido com 1 ml de água destilada e transferido para membrana de diálise onde foi submetido inicialmente à diálise por 2 vezes com intervalo de 12 horas em água destilada e em seguida submetida a duas diálises com PBS com intervalo de 6 horas. Posteriormente as amostras foram alíquotadas e congeladas a -20°C.

5.2.5 Purificação de IgG de soro utilizando coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G

Após o soro ser purificado utilizando ácido caprílico, a solução contendo IgG foi submetida à purificação com coluna de afinidade (HiTrap™ IgG- GE) com capacidade para 1 ml e capacidade de ligação de até 25 mg de IgG. Inicialmente a coluna foi preparada e lavada com 4 ml de tampão de Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0 (tampão de início). Após equilibrada a coluna com 3 ml de tampão de início, amostras contendo 20,5 mg/ml (coelho) e 23,35 mg/ml (cabra) foram passadas uma em cada coluna, respectivamente. Imediatamente foi adicionado 3 ml do tampão de Glicina- HCl 0,1 M , pH 2,7 (tampão de eluição). As amostras foram colhidas em aliquotas de 0,5 ml num total de seis tubos e congeladas a -20°C.

5.2.6 Biotinilação de anticorpos IgG de coelho e cabra anti-IgY de avestruz

Para a biotinilação da IgG purificada de cada animal, foi utilizado uma coluna de gel filtração com capacidade de ligação de até 10 mg/ml (Kit Immunoprobe Biotinylation – Sigma). Inicialmente a coluna foi equilibrada com 30 ml de PBS 0,01M. Em seguida foi aplicada a coluna uma solução contendo 1 ml de IgG a 10 mg/ml em tampão de Fosfato de Sódio, pH 7,2 misturada com 38 µl de reagente de biotinilação (BAC-SulfoNHS). Esta solução antes de ser aplicada passou por uma incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após passar a amostra, a coluna foi eluída com 9 ml de PBS 0,01M e imediatamente foram colhidas alíquotas contendo 1 ml cada que foram congeladas a -20°C e analisadas posteriormente.

5.2.7 Avaliação da especificidade da IgG marcada com biotina Anti-IgY de avestruzes frente a anticorpos de diferentes espécies animais através de ELISA

A especificidade do anti-anticorpo marcado de coelho e cabra foi testada por ELISA contra soros de diferentes espécies de aves e mamíferos e répteis. Das aves, foram testados

soros de avestruz (*Struthio camelus*), galinha (*Gallus domesticus*), ema (*Rhea americana*), papagaio (*Psittacus erithacus*), ganso (*Anser domesticus*). Dos mamíferos, foram testados soros de bovino (*Bos taurus*), caprino (*Capra hircus*), canino (*Canis familiaris*), gato (*Felis domesticus*) e leão (*Panthera Leo*). Dos répteis foi testado o soro de tartaruga (*Dermochelys coriácea*).

A sensibilização da placa para o teste de ELISA, foi feita com soro na diluição de 1:1.000 em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 e a placa foi incubada a 37⁰ C por 2 h. Em seguida foi feita uma lavagem com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST). Após a placa foi bloqueada com gelatina 1% diluída em PBS (PBSG), deixando 1 hora em temperatura ambiente e então lavada quatro vezes com PBST. Em seguida foi adicionado 50 µl em cada poço do anticorpo anti-avestruz diluído 1:1000 até 1:12187.000 em PBSTG e a placa foi incubada a 37⁰C por 45 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, a placa foi lavada com PBST por três vezes. Em seguida, foi adicionado em cada poço 50 µl de avidina marcada com peroxidase na diluição de 1:1.000 e a placa então incubada por 1 hora. Após 4 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 µl de água oxigenada 30V e 5 mg de orto-fenildiamina (OPD). Após, a placa foi incubada por 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl de H₂SO₄ 3 N, sendo a placa lida em espectrofotômetro a 492 nm.

5.3 Determinação da presença de *E. coli* e *S. aureus* em fezes de avestruzes (*Struthio camelus*) em criações dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo

5.3.1 Colheita de Fezes

Foram colhidas amostras de fezes de 250 avestruzes de criações localizadas nos municípios de São Francisco de Itabapoana e Saquarema localizado no Estado do Rio de Janeiro e do município de Guarapari localizado no Estado do Espírito Santo. As análises microbiológicas foram realizadas a partir das colheitas de fezes e de suabes cloacais, para avaliação da microbiota dos animais. As amostras de fezes depois de colhidas foram

colocadas em frascos estéreis, transportadas sob refrigeração para o laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF.

5.3.2 Isolamento bacteriano

Das amostras de fezes foram retiradas 10g, diluídas em 90 ml de PBS (diluição 10^{-1}) e partir dessa foram feitas diluições sucessivas até 10^{-3} . As amostras de fezes diluídas, assim como os suabs foram semeadas em Agar MacConkey, Agar EMB (Eozin Methilene Blue), agar Vogel-Johnson enriquecido com telurito de potássio e agar sangue enriquecido com sangue de carneiro 10%. Essas placas foram incubadas a 37°C, em estufas bacteriológicas por um período de até 72 horas com observação do crescimento de micro-organismos às 24, 48 e 72 horas.

5.3.3 Caracterização bacteriana

Após o período de incubação, as colônias foram submetidas a exames macroscópicos observando-se as características como tamanho, forma, odor, pigmento e hemólise. Microscopicamente foram observadas as características tintoriais e morfologia bacteriana pela técnica de Gram. As identificações de *E. coli* e *S. aureus* foram feitas pelas provas bioquímicas tradicionais e através do sistema de identificação com o kit da bioMérieux e interpretadas pelo software miniApi (bioMérieux, França).

5.3.4 Análise do Perfil de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados de *E. coli* e *S. aureus*, foram caracterizadas de acordo com seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Tal sensibilidade, foi analisada através da técnica de disco difusão em agar. Para esta técnica, foi utilizada o meio Ágar Mueller-Hinton distribuído em placas de 150 mm de diâmetro. O inóculo foi preparado pelo método de suspensão direta e a

turbidez comparada com a escala de McFarland em espectrofotômetro. A suspensão foi inoculada e distribuída de forma homogênea sobre o ágar. Após os discos contendo antibióticos foram colocados cerca de 3 cm de distância um do outro. As placas inoculadas foram incubadas por 24 horas e a leitura do halo de inibição foi realizada (KONEMAN et al., 2001). Foram utilizados 12 discos antibacterianos (Laborclin, Brasil), contendo as seguintes drogas: para bactérias Gram-positivas: amoxicilina (AMO, 10 µg), clindamicina (CLI, 2µg), cefalotina (CFL, 30µg), penicilina G (PEN, 10 UI), oxacilina (OXA, 1 µg), tetraciclina (TET 30µg), ampicilina (AMP, 10µg), eritromicina (ERI, 15µg), sulfazotrim (SUL, 25 µg), gentamicina (GEN, 10µg), cefoxitina (CFO, 30µg) e vancomicina (VAN, 30µg); Meticilina (MET,). Para as bactérias Gram-negativas: tetraciclina (TET, 30µg), cloranfenicol (CLO, 30µg), Enrofloxacina (ENO, 30µg), amoxicilina e ac. Clavulanico (AMC, 10µg), gentamicina (GEN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), cefoxitina (CFO, 30µg), tobramicina (TOB, 10µg), ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (CFL, 30µg) e sulfazotrim (SUT, 25µg).

5.3.5 Análise molecular

5.3.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit BLOOD GENOMIC PREP SPIN KIT (GE Healthcare). As amostras foram cultivadas em caldo BHI para o crescimento de cada bactéria e em seguida as células foram centrifugadas para formação do sedimento bacteriano. O protocolo seguiu os seguintes passos: Inicialmente os tubos plásticos de 1,5 ml contendo o sedimento foram identificados com os códigos respectivos das amostras. Em seguida foi adicionado a cada tubo 20µl de Proteinase K . Após foi adicionado 400 µl de Lysis solution e incubado 10 minutos na bancada. Na sequência uma centrifugação a 11.000 rpm por 30 segundos. Após foi adicionado 600 µl da solução em cada coluna. Nova centrifugação a 11.00 rpm por 1 minuto. Após foi descartado o conteúdo do Collection tube e adicionado 500µl de Lysis Solution seguido de nova centrifugação a 11.000 rpm por 1 minuto. O conteúdo do Collection tube foi então descartado e adicionado 500µl de

Wasch Buffer seguido de centrifugação a 11.000 rpm por 3 minutos. Os tubos finais foram marcados com os códigos respectivos das amostras e as colunas foram adicionadas aos mesmos. Em seguida foi adicionado 200µl de Elution Buffer, previamente aquecido a 70°C diretamente na coluna, e incubado por 1 minuto na bancada. Finalmente foi efetuada nova centrifugação a 11.000 RPM por 1 minuto, e a coluna descartada e o tubo contendo DNA foi armazenado no freezer (-20 °C) para posterior utilização.

5.3.5.2 Realização do PCR

A amplificação do DNA para *E. coli* foi realizada de acordo com Aranda et al. (2007) Nesta etapa, o objetivo foi detectar a presença do fator de virulência de *E. coli* enteropatogênicas típicas (EPEC) (gene estrutural para BfpA) conforme tabela 1.

O PCR monoplex foi realizado com um volume total de 50 µl de uma mistura contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 2 mM de cada deoxynucleosideo trifosfato, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 5 µl de DNA das amostras e 2 µl de “primers”. O PCR foi realizado nas seguintes condições: 50°C (2 minutos 1 ciclo), 95°C (5 minutos 1 ciclo) e 40 ciclos de 95°C (1 minuto), 50°C (1 minuto), 72°C (1 minuto) e 72°C (7 minutos 1 ciclo). Após o produto do PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 3 - Gen, sequência de oligonucleotídeo, tamanho do produto amplificado em pares de base e temperatura de anelamento utilizado.

Gene	Sequência de oligonucleotídeo (5' a 3')	Tamanho do produto amplificado em pares de base (pb)	T°C Anelamento
BfpA	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	60 °C

* Sequência de Oligonucleotídeo segundo Aranda et al., (2007).

6 RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento e avaliação da ação de anticorpos IgY produzidos em avestruzes imunizados contra proteínas recombinantes de *S. aureus* e *E. coli*

6.1.1 Extração e Purificação de anticorpos IgY de gema de ovos de avestruzes

A extração de proteínas mostrou-se eficiente nos dois métodos com concentrações de IgY que variou entre 72,66 mg/ml a concentrações de 316,49 mg/ml (Tabela 4). Nas figuras 1 e 2 podemos observamos o perfil eletroforético da IgY das gemas extraídas com 20 % de sulfato de amônia e 19% de sulfato de sódio respectivamente. Ressalta-se ainda na figura 1 e 2 bandas com aproximadamente 66 kDa e outra com aproximadamente 25 kDa correspondendo a cadeia pesada e leve da IgY de avestruz.

Tabela 4 - Concentrações de IgY extraídas de gema de ovos de avestruzes utilizados no experimento com Sulfato de Sódio a 19% ou Sulfato de Amônia a 20%.

Amostra	Sulfato de Sódio 19%	Sulfato de Amônia 20%
ML05	72,66 mg/ml	112,4 mg/ml
GA 03	229,12 mg/ml	316,49 mg/ml
EQ17	298,22 mg/ml	300,02 mg/ml
EQ27	210,56 mg/ml	284,36 mg/ml

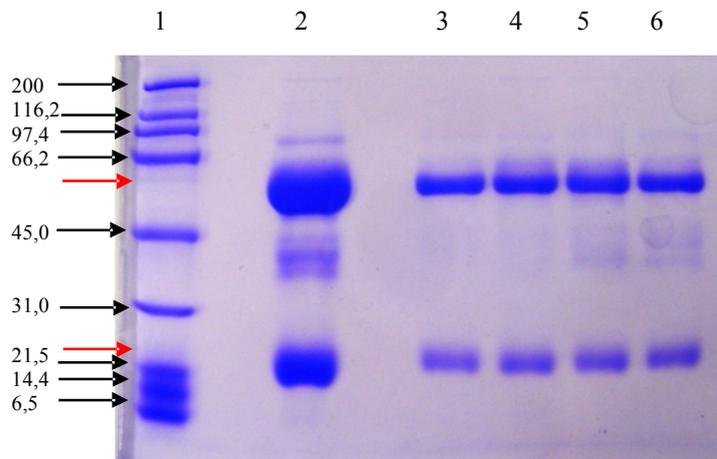


Figura 1 - Gel de SDS-PAGE de amostras extraídas com 20% de sulfato de amônia (S.A.) corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY das fêmeas após inoculação com proteínas recombinantes nos animais utilizados no experimento. Linha 1- Peso molecular; Linha 2- IgY Controle; Linha 3- IgY (EQ17) inoculada com SECrec; Linha 4- IgY (GA03) inoculada com RAPrec; Linha 5 – IgY (ML05) inoculada com BFPrec; Linha 6- IgY (EQ27) inoculada com EspBrec. As setas vermelhas indicam respectivamente, as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas.

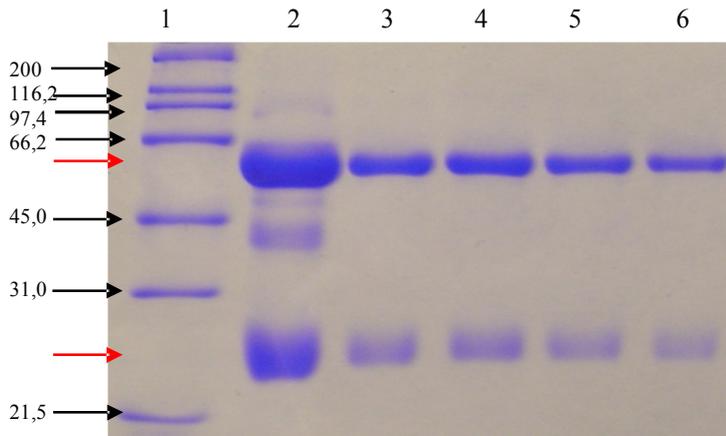
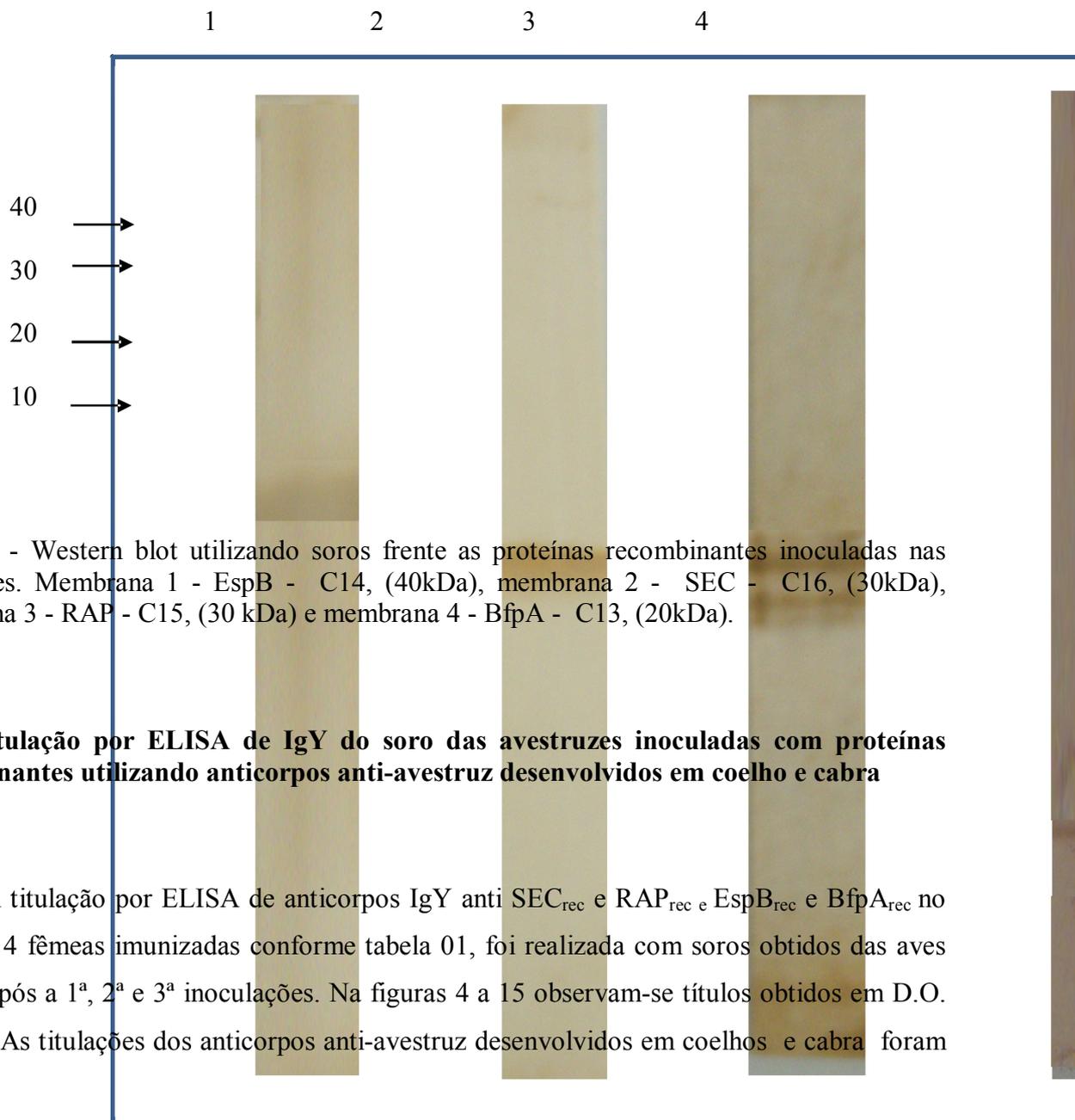


Figura 2 - Gel de SDS-PAGE de amostras extraídas com 19% de sulfato de sódio (S.S.) corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY das fêmeas após inoculação das proteínas recombinantes nos animais utilizados no experimento. Linha 1- Peso molecular; Linha 2- IgY Controle; Linha 3- IgY (EQ17) inoculada com SECrec; Linha 4- IgY (GA03) inoculada com RAPrec; Linha 5 – IgY (ML05) inoculada com BfpArec; Linha 6- IgY (EQ27) inoculada com EspBrec. As setas vermelhas indicam, respectivamente, as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas.

6.1.2 Western blot

Na figura 3 é possível observar o resultado do teste de “Western blot” para detecção da especificidade do soro das aves frente as proteínas recombinantes inoculadas. Nas membranas foi demonstrada a capacidade do anticorpo em reconhecer as proteínas recombinantes EspB (membrana 1 PM 40 kDa), SEC (membrana 2 PM 30 kDa), RAP (membrana 3 PM 30 kDa) e BfpA (membrana 4 PM 20 kDa).



6.1.3 Titulação por ELISA de IgY do soro das aves inoculadas com proteínas recombinantes utilizando anticorpos anti-avestruz desenvolvidos em coelho e cabra

A titulação por ELISA de anticorpos IgY anti SEC_{rec} e RAP_{rec} e EspB_{rec} e BfpA_{rec} no soro das 4 fêmeas imunizadas conforme tabela 01, foi realizada com soros obtidos das aves antes e após a 1^a, 2^a e 3^a inoculações. Na figuras 4 a 15 observam-se títulos obtidos em D.O. 492 nm. As titulações dos anticorpos anti-avestruz desenvolvidos em coelhos e cabra foram

superiores, quando comparados com os resultados obtidos com os anticorpos de IgG desenvolvidos em cabra contra galinha (comercial Sigma®).

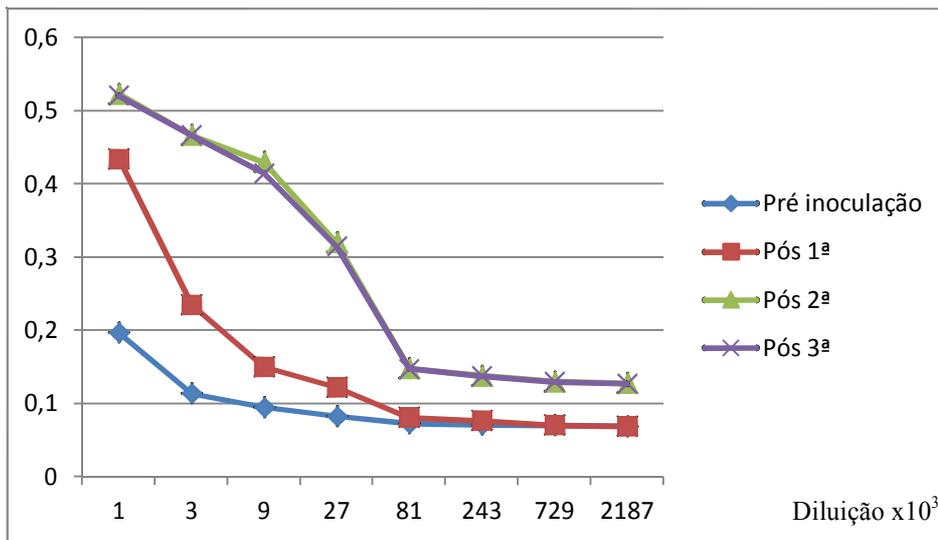


Figura 4 – D.O. de anticorpos IgY anti- RAP por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em galinha (comercial Sigma®). Soros das avestruzes imunizadas com RAPrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

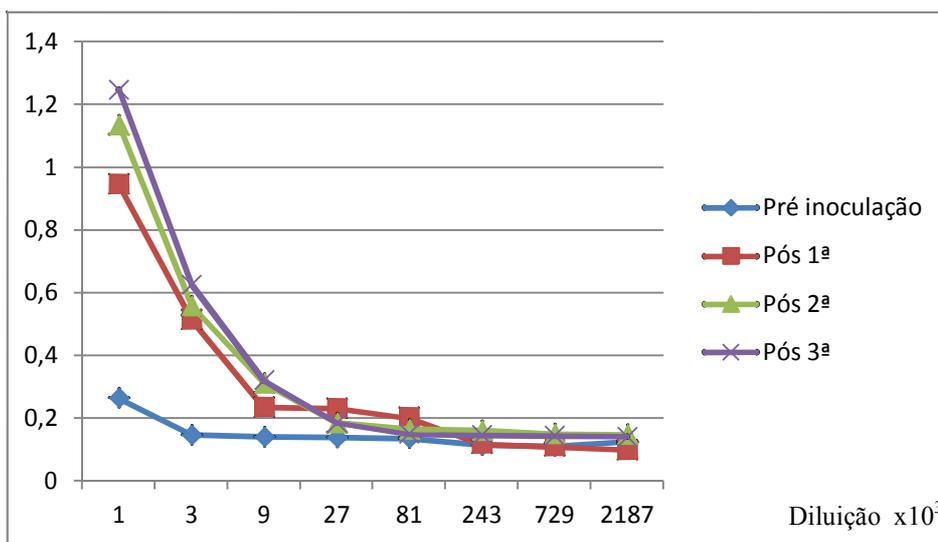


Figura 5 – D.O. de anticorpos IgY anti- RAP por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em coelho. Soros das avestruzes imunizadas com RAPrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

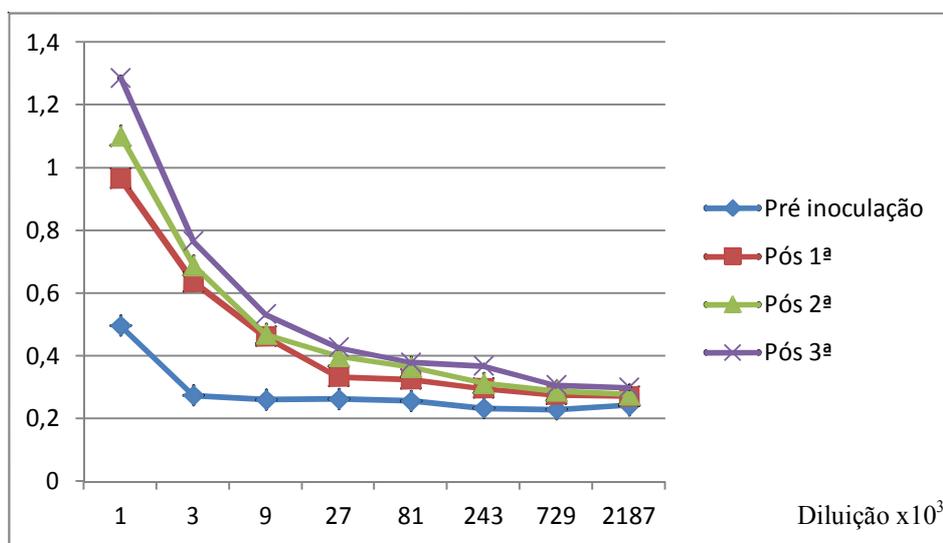


Figura 6 – D.O. de anticorpos IgY anti- RAP por ELISA utilizando anticorpos anti- IgY produzido em cabra. Soros das avestruzes imunizadas com RAPrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

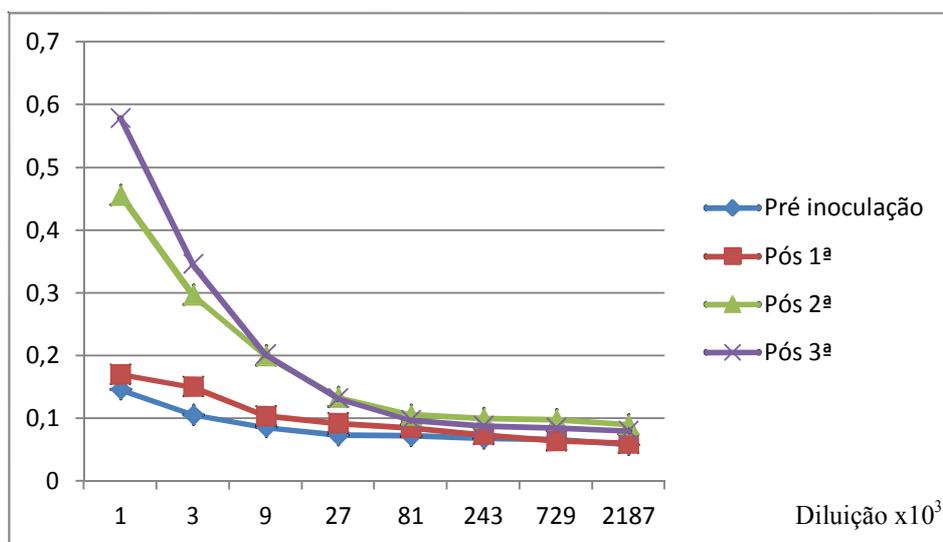


Figura 7 – D.O. de anticorpos IgY anti- SEC por ELISA utilizando anticorpos anti-igY produzido em galinha (comercial Sigma®). Soros das avestruzes imunizadas com SECrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

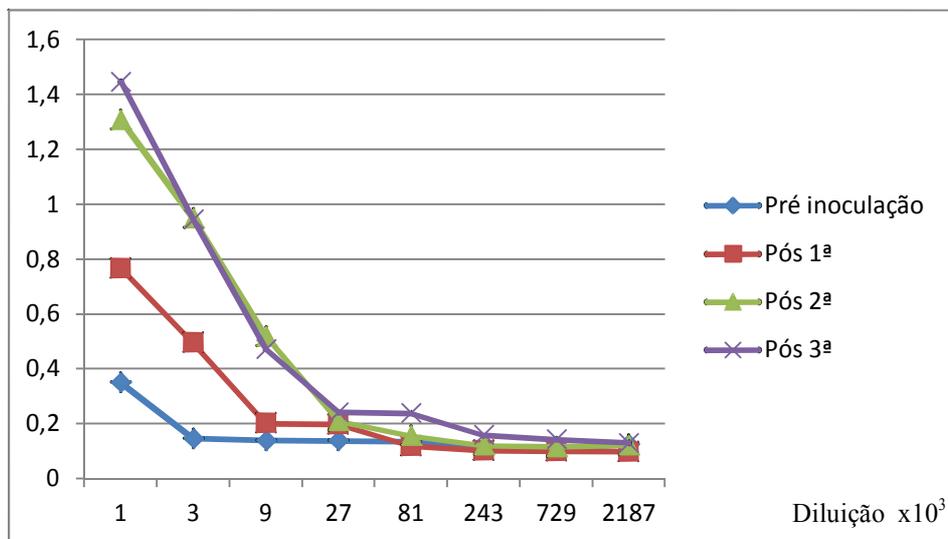


Figura 8 – D.O. de anticorpos IgY anti- SEC por ELISA utilizando anticorpos anti-igY produzidos em coelho. Soros das avestruzes imunizadas com SECrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

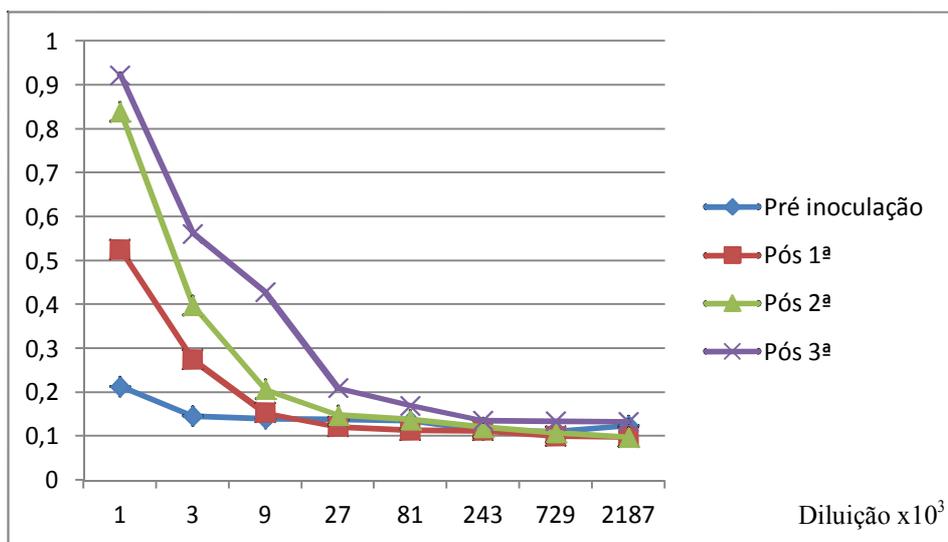


Figura 9 – D.O. de anticorpos IgY anti- SEC por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em cabra. Soros das avestruzes imunizadas com SECrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

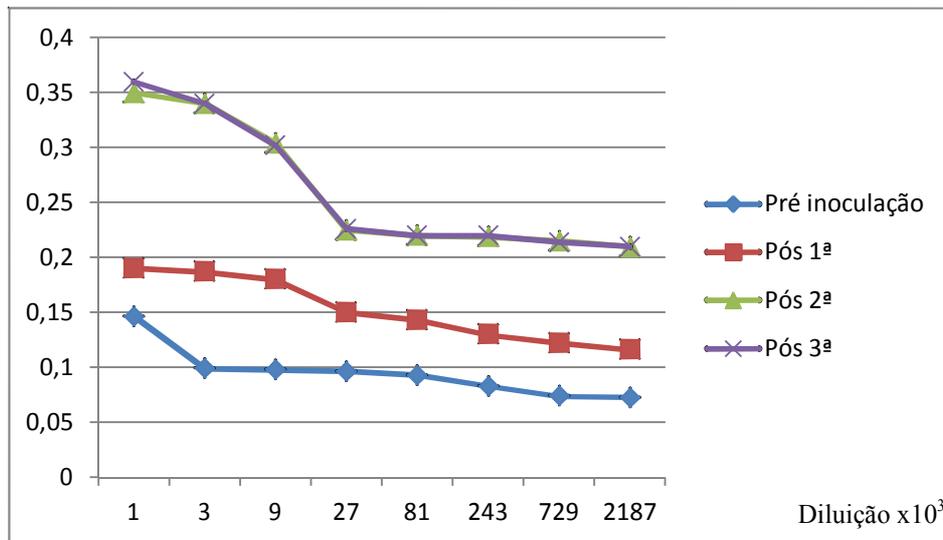


Figura 10 – D.O. de anticorpos IgY anti- BfpA por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em galinha (comercial Sigma®). Soros das avestruzes imunizadas com BfpArec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

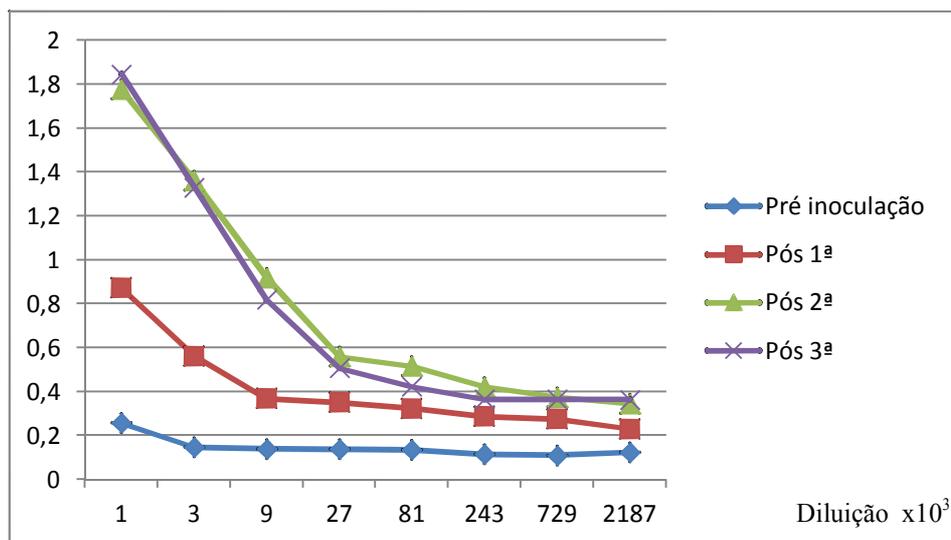


Figura 11 – D.O. de anticorpos IgY anti- BfpA por ELISA utilizando anticorpos anti- IgY produzido em coelho. Soros das avestruzes imunizadas com BfpArec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

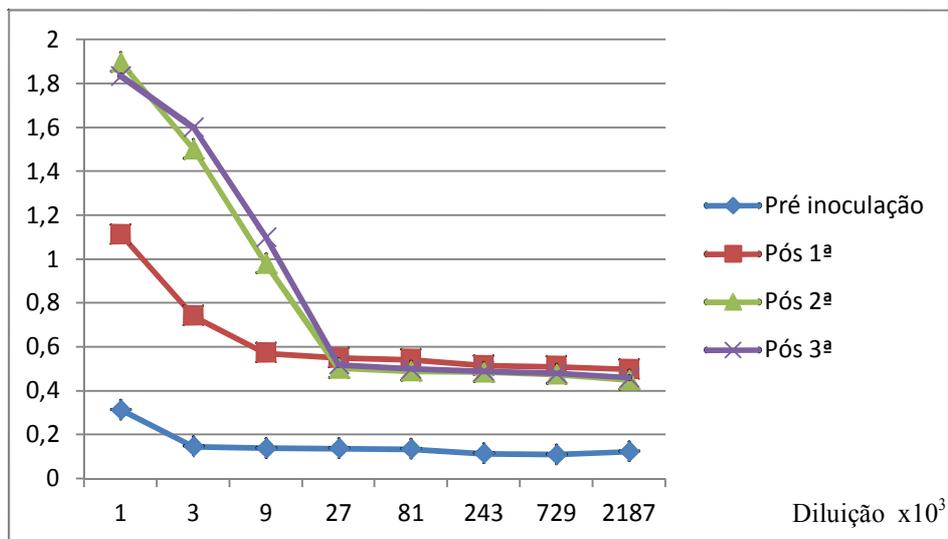


Figura 12 – D.O. de anticorpos IgY anti- BfpA por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em cabra. Soros das avestruzes imunizadas com BfpArec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

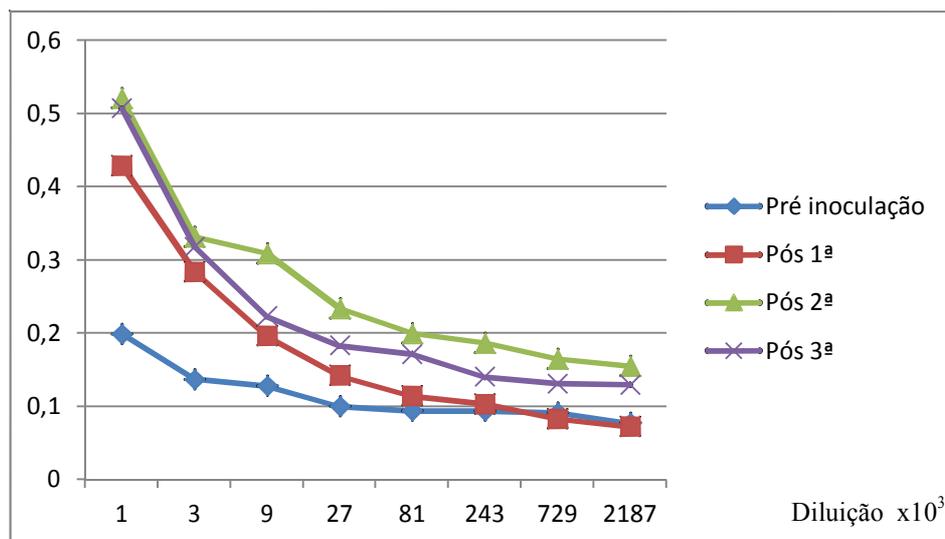


Figura 13 – D.O. de anticorpos IgY anti- EspB por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em galinha (comercial Sigma®). Soros das avestruzes imunizadas com EspBrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

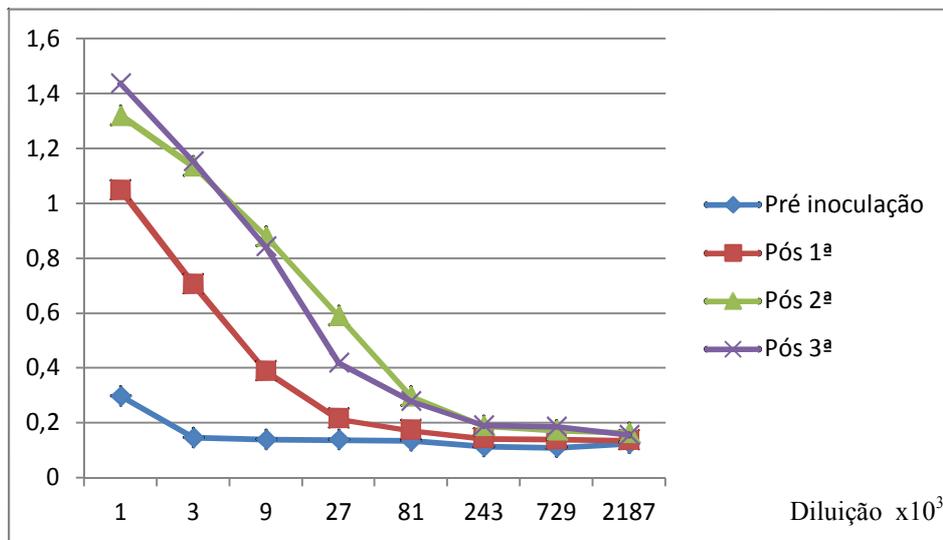


Figura 14 – D.O. de anticorpos IgY anti- EspB por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em coelho. Soros das avestruzes imunizadas com EspBrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

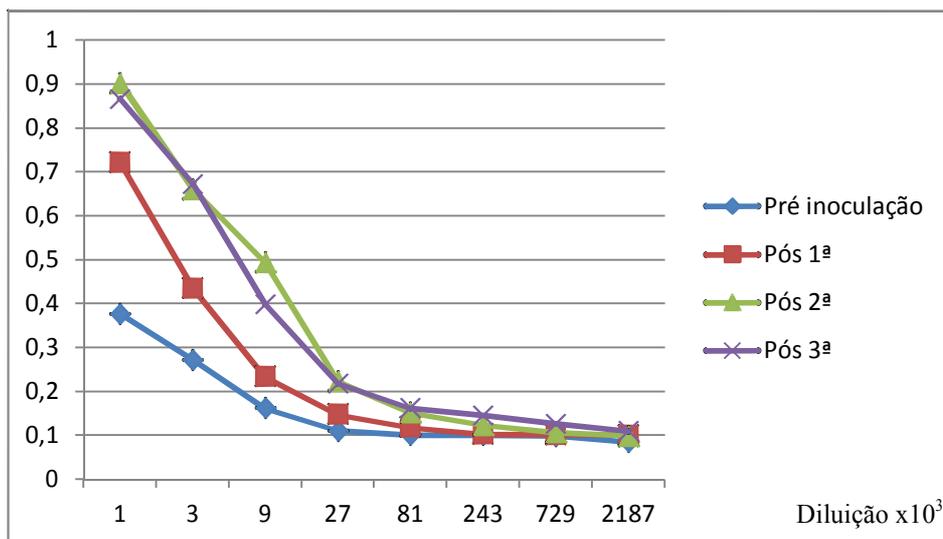


Figura 15 – D.O. de anticorpos IgY anti- EspB por ELISA utilizando anticorpos anti-IgY produzido em cabra. Soros das avestruzes imunizadas com EspBrec colhidos antes e após a 1ª (linha vermelha), 2ª (linha verde) e 3ª inoculações (linha roxa).

6.1.4 Avaliação da ação de anticorpos IgY anti-SEC_{rec}, anti-RAP_{rec} e anti-EspB_{rec} e anti-BfpA_{rec}, sobre o crescimento de cepas de *S. aureus* e *E. coli*

6.1.4.1 Inibição sobre o crescimento de cepas de *S. aureus*

Para demonstrar a atividade de anticorpos IgY anti SEC_{rec}, RAP_{rec}, foram utilizadas cinco cepas de *S. aureus* (Saost1 e Saost2, FRI361, LSA88 e ATCC 25923). A figura 16 ilustra a inibição ($p < 0,05$) no crescimento das cepas utilizadas a partir das diferenças entre as médias analisadas nos tratamentos com IgY pré e pós tratamentos utilizando o método de extração com sulfato de sódio (S.S) e sulfato de Amônia (S.A.) Os resultados obtidos em ambos métodos de extração não mostraram diferenças significativas entre si. Por outro lado, os resultados demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e o controle. A figura 17 (A a H) demonstra visualmente a inibição bacteriana comparando os tratamentos pré e pós.

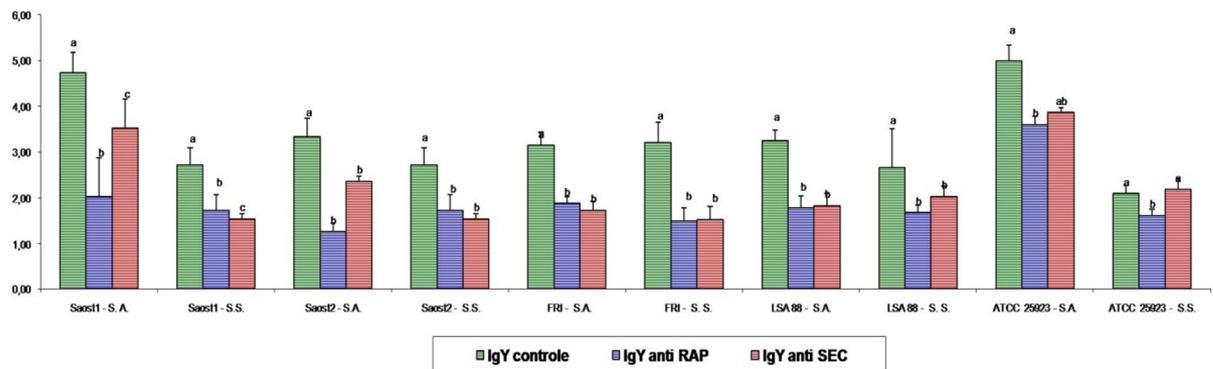


Figura 16 – Atividade de inibição de crescimento de *S. aureus* utilizando IgY anti SEC_{rec} e RAP_{rec} extraídas de gemas de avestruzes após 4 horas de incubação. Diferenças de médias DO_{550 nm} pré e pós tratamentos. IgY extraído com Sulfato de Amônia (S.A.) ou Sulfato de Sódio (S.S.).

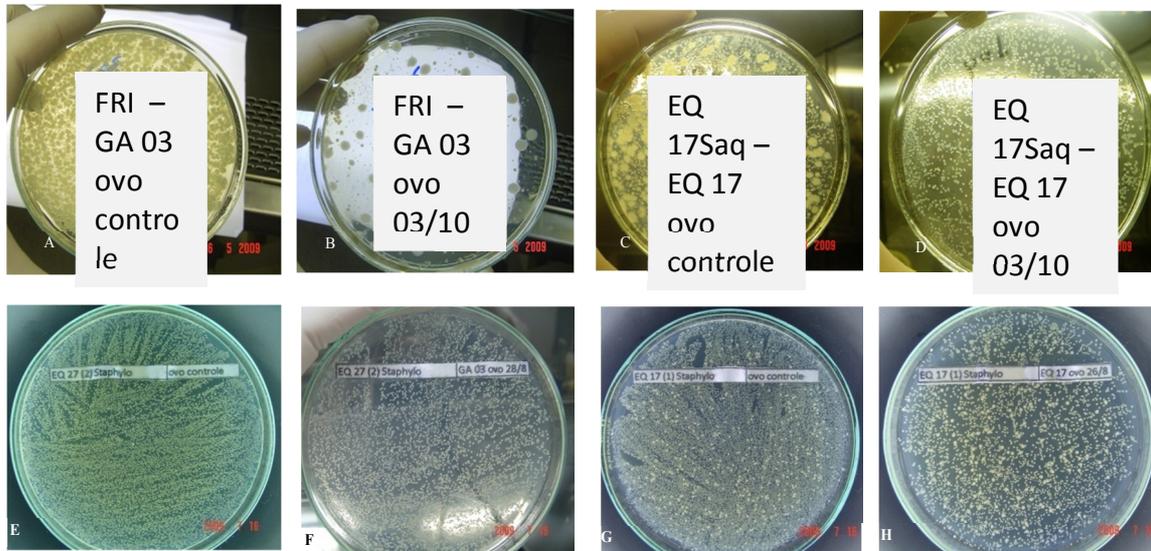


Figura 17- Atividade de inibição de crescimento de *S. aureus* (FRI 361) utilizando anticorpos IgY anti RAPrec extraídas com S.S. (A e B) e de *S. aureus* (Saost2) com S.A (E e F) de gemas de avestruzes pré e pós tratamentos (A e B). Atividade de inibição de crescimento de *S. aureus* (Saost1) utilizando anticorpos IgY anti SECrec extraídas com S.S. (C e D) e S.A. (G e H) de gemas de avestruzes pré e pós tratamentos . À esquerda (A e C, E e G) controle negativo mostrando crescimento confluyente das células e a direita (B e D, F e H) colônias isoladas após os tratamentos.

6.1.4.2 Inibição sobre o crescimento de cepas de *E. coli*

A figura 18 ilustra a inibição ($p < 0,05$) no crescimento das cepas utilizadas a partir das diferenças entre as médias analisadas nos tratamentos com IgY pré e IgY pós tratamentos utilizando o método de extração com sulfato de sódio (S.S) e sulfato de Amônia (S.A.) Os resultados obtidos em ambos métodos de extração não mostraram diferenças significativas entre si. Por outro lado, os resultados demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e o controle. A figura 19 (A a H) demonstra visualmente a inibição bacteriana comparando os tratamentos pré e pós.

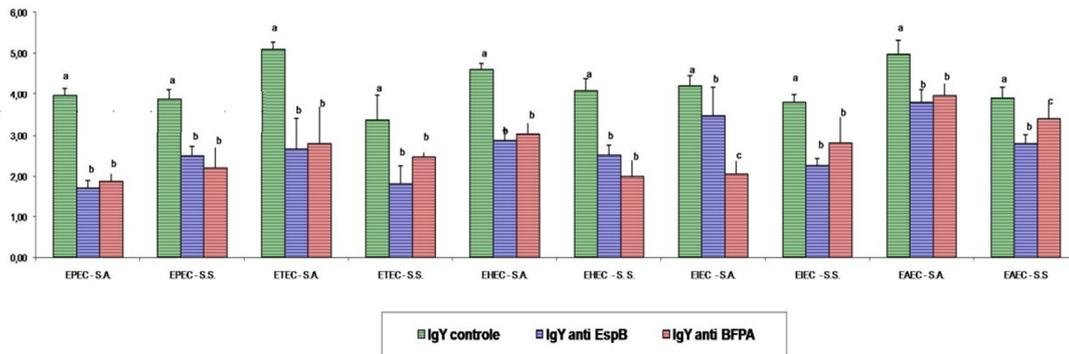


Figura 18 - Atividade de inibição de crescimento de *E. coli* utilizando IgY anti EspBrec e BfpArec extraídas de gemas de avestruzes após 4 horas de incubação. Diferenças de médias DO 550 nm pré e pós tratamentos. IgY extraído com Sulfato de Amônia (S.A.) ou Sulfato de Sódio (S.S.).

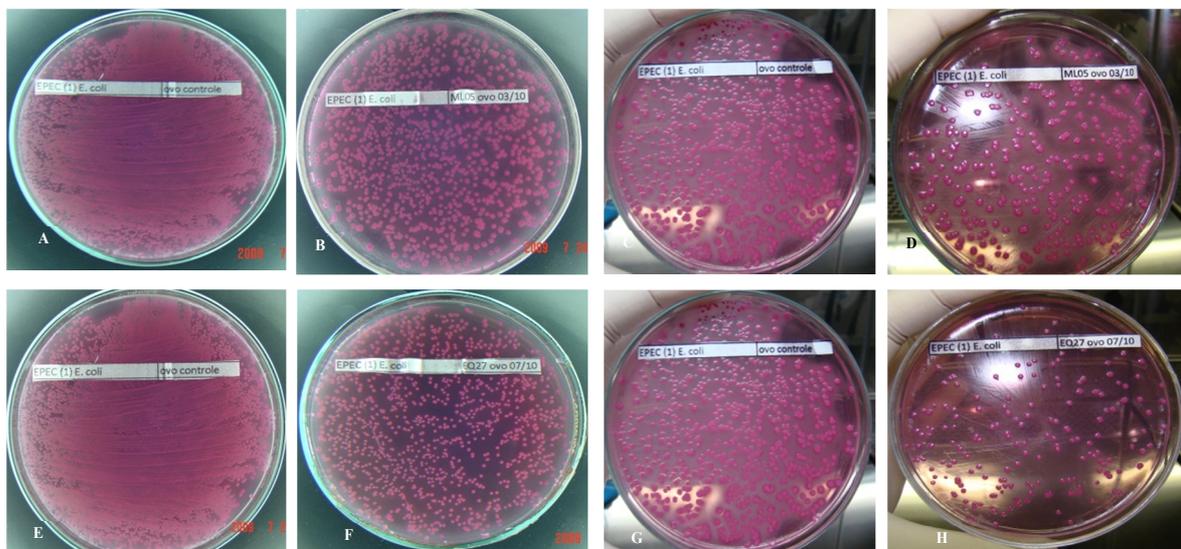


Figura 19 - Atividade de inibição de crescimento de *E. coli* (EPEC) utilizando anticorpos IgY anti BfpArec extraídas com S.S. (A e B) e S. A. (E e F) de gemas de avestruzes pré e pós tratamentos. Atividade de inibição de crescimento de *E. coli* (EPEC) utilizando anticorpos IgY anti EspBrec extraídas com S.S. (C e D) e S.A. (G e H) de gemas de avestruzes pré e pós tratamentos. À esquerda (A e C, E e G) controle negativo mostrando crescimento confluyente das células e a direita (B e D, F e H) colônias isoladas após os tratamentos.

6.2 Produção e avaliação da utilização de anticorpos anti-avestruz IgY

A figura 20 demonstra o perfil eletroforético da amostra (C19) extraída da gema do ovo de uma fêmea adulta e utilizada como amostra inicial no processo de purificação da IgY para posterior inoculação em coelhos e cabra. Observa-se nesta figura, uma banda com aproximadamente 66 kDa e outra, com aproximadamente 25 kDa, correspondendo às cadeias pesada e leve da IgY.

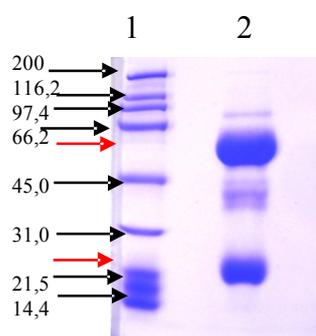


Figura 20 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY amostra C19 utilizada para purificação e inoculação dos animais. As setas vermelhas indicam as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas.

6.2.1 Purificação de anticorpos- IgY utilizando coluna de afinidade HiTrap™ IgY

Para obtenção de material mais purificado, amostras de IgY extraídas pelo método de precipitação por sulfato de amônia foram aplicadas em uma coluna de afinidade específica para IgY (HiTrap™ IgY™ – GE). As Figuras 21 e 22 demonstram o resultado da purificação após a passagem pela coluna de afinidade. Pode-se notar em sequência crescente que as amostras iniciais (colunas 2 a 6) apresentam bandas de proteínas indesejáveis. Nota-se também que, nas alíquotas de 7 a 14, as bandas consideradas contaminantes e indesejáveis foram eliminadas após as sequências durante o processo de purificação. Pode-se notar ainda nestas figuras, uma banda de aproximadamente 66 kDa e uma banda de aproximadamente 25 kDa, o que corresponde às cadeias pesada e leve da IgY, respectivamente.

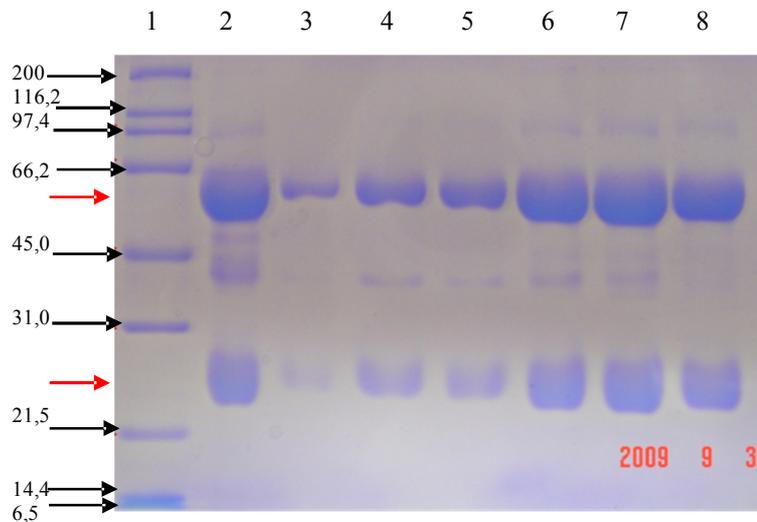


Figura 21 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY amostra C19 antes e após a passagem pela coluna de purificação HiTrap™ IgY. Linha 1- Peso molecular, Linha 2- Amostra original (C19), Linha 3 – alíquota 2 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 4 - alíquota 3 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 5 - alíquota 4 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 6 - alíquota 5 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 7- alíquota 6 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 8 - alíquota 7 pós passagem pela coluna de purificação. As setas vermelhas indicam, respectivamente, as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas.

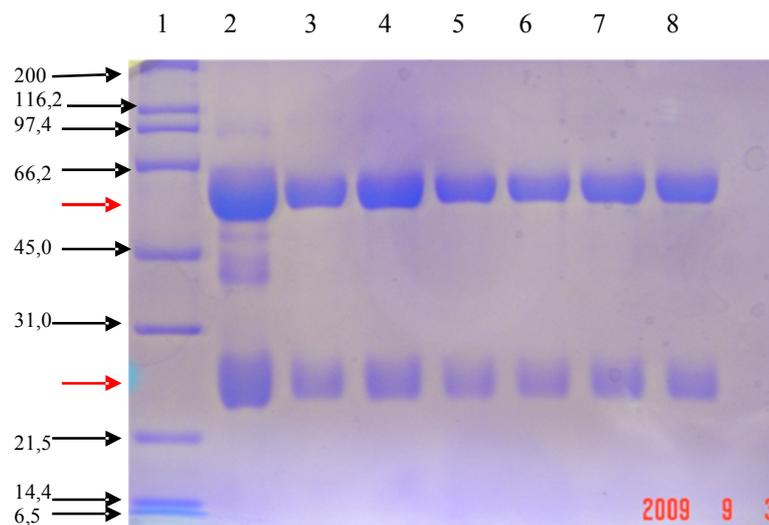


Figura 22 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. Perfil eletroforético da IgY amostra C19 antes e após a passagem pela coluna de purificação HiTrap™ IgY. Linha 1- Peso molecular, Linha 2- Amostra original (C19), Linha 3 – alíquota 8 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 4 - alíquota 9 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 5 - alíquota 10 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 6 - alíquota 11 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 7- alíquota 12 pós passagem pela coluna de purificação, Linha 8 - alíquota 14 pós passagem pela coluna de purificação. As setas vermelhas indicam, respectivamente, as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas.

6.2.3 Titulação do soro dos animais pelo teste de ELISA

A titulação por ELISA de anticorpos IgG anti-IgY no soro dos coelhos e da cabra imunizados (tabela 2). As figuras 23, 24, 25 e 26, demonstram os títulos das diluições em D.O. 492 nm nos soros dos quatro animais inoculados.

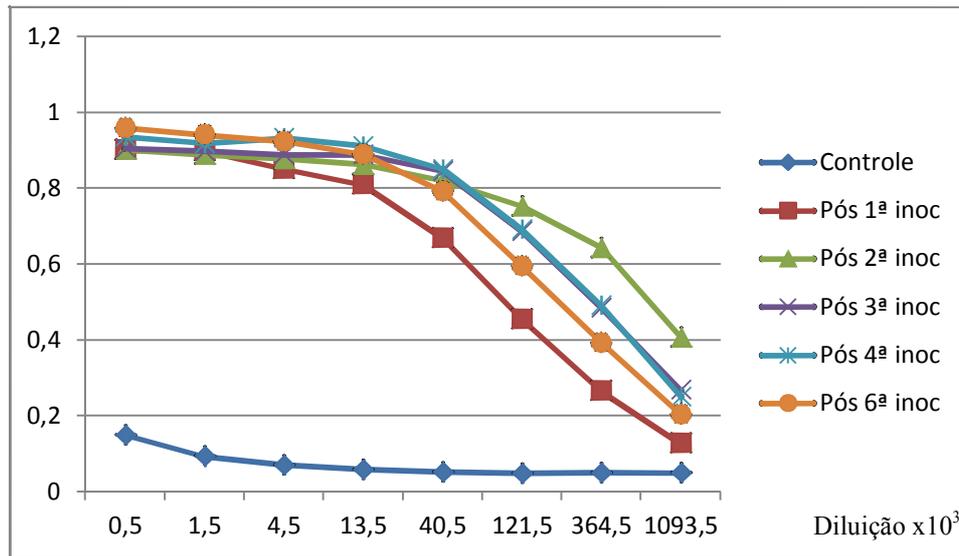


Figura 23 – Título de anticorpos por ELISA de IgG de coelho anti-IgY. As linhas coloridas mostram a titulação de soro do coelho nº1, imunizado com IgY colhidos no dia zero e após a 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 6ª inoculações.

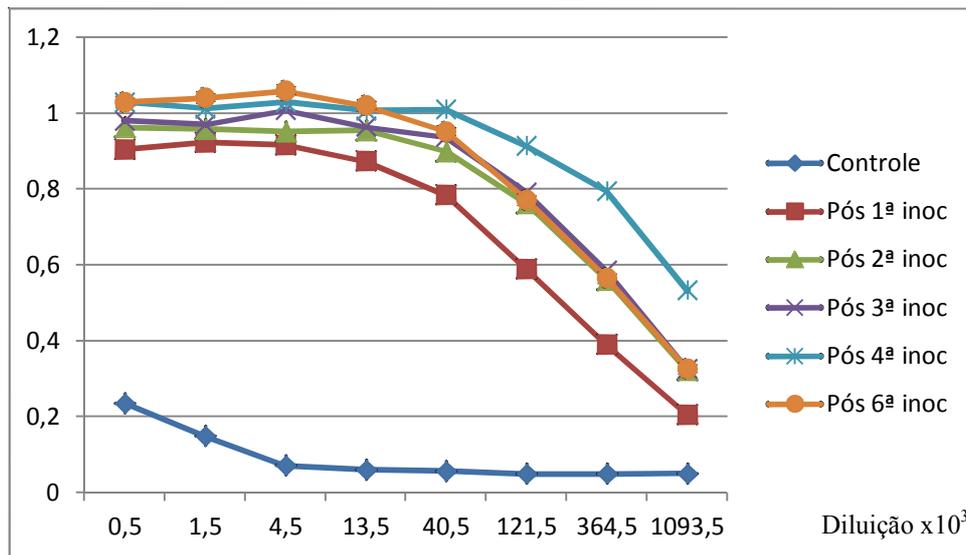


Figura 24 - Título de anticorpos por ELISA de IgG de coelho anti-IgY. As linhas coloridas mostram a titulação de soro do coelho nº2, imunizado com IgY colhidos no dia zero e após a 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 6ª inoculações.

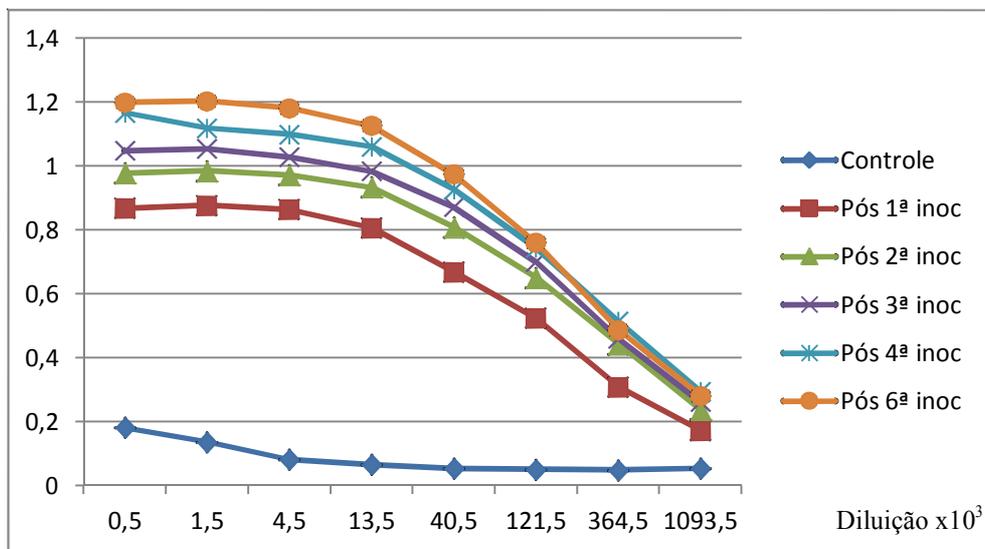


Figura 25 - Titulo de anticorpos por ELISA de IgG de coelho anti-IgY. As linhas coloridas mostram a titulação de soro do coelho nº3, imunizado com IgY colhidos no dia zero e após a 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 6ª inoculações.

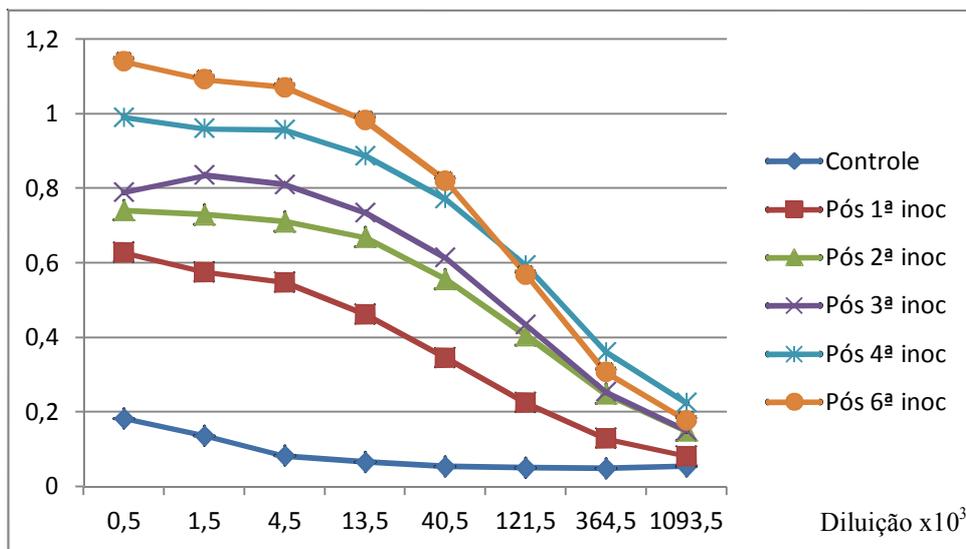


Figura 26 - Titulo de anticorpos por ELISA de IgG de cabra anti-IgY. As linhas coloridas mostram a titulação de soro de cabra, imunizada com IgY colhidos no dia zero e após a 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 6ª inoculações.

6.2.4 Purificação de IgG de soro utilizando utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia e coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G

Inicialmente a IgG de cabra e de coelho foi extraída e purificada utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia, conforme item 5.2.5. Em seguida, foi utilizada a coluna de afinidade HiTrap™ para proteína G (GE healthcare). As Figuras 27 e 28 demonstram o resultado da purificação utilizando os dois métodos. Pode-se notar que, a amostra purificada inicialmente com ácido caprílico e sulfato de amônio, ainda apresenta bandas indesejáveis. Nota-se também que, nas amostras subsequentes (3, 4 e 5), as bandas consideradas contaminantes foram eliminadas pelo processo de purificação utilizando a coluna de afinidade e ainda, bandas de aproximadamente 50 kDa e 25 kDa, que correspondem às cadeias pesada e leve da IgG, respectivamente.

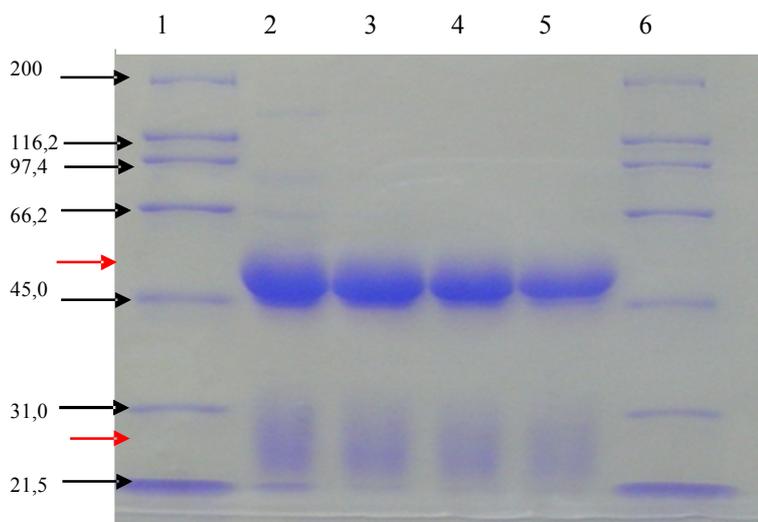


Figura 27- Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. IgG de coelho purificada pelo ácido caprílico e sulfato de amônia seguido da purificação pela coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G. Linha 1- Peso molecular, Linha 2- Amostra original, Linha 3 - alíquota 3 pós purificação, Linha 4 - alíquota 4 pós purificação, Linha 5 - alíquota 5 pós purificação, Linha 6- Peso molecular. As setas vermelhas indicam as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas.

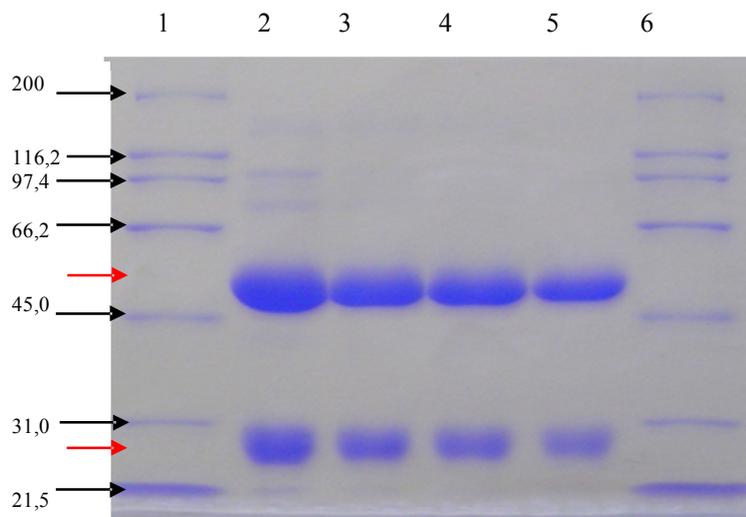


Figura 28 - Gel de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. IgG de cabra purificada pelo ácido caprílico e sulfato de amônia seguido da purificação pela coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G. Linha 1- Peso molecular, Linha 2- amostra original, Linha 3 - alíquota 3 pós purificação, Linha 4 - alíquota 4 pós purificação, Linha 5 - alíquota 5 pós purificação, Linha 6- Peso molecular. As setas vermelhas indicam as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas, respectivamente.

6.2.5 Biotinilação de anticorpos IgG de coelho e cabra anti-avestruz (Kit Immunoprobe Biotinylation™ – Sigma)

Durante o processo de biotinilação, foram colhidas 7 alíquotas de 1,0 ml cada, em microtubos de 1,5 ml. As amostras foram quantificadas pelo método do ácido biscinonínico e apresentaram concentrações variadas em todas as amostras colhidas após a passagem pela coluna. De acordo com as figuras 29 e 30, é possível observar que nas alíquotas 1 e 2 ainda não houve a passagem das imunoglobulinas. Nas alíquotas 3 e 4, tanto na passagem da IgG de coelho quanto na passagem de IgG de cabra, houve a eluição máxima das proteínas. Nas alíquotas 5, 6 e 7 nota-se a ausência de proteínas após a eluição. Nas alíquotas de número 3 foram encontradas a concentrações de 9,54 mg/ml e 8,65 mg/ml para cabra e coelho, respectivamente, e nas alíquotas de número 4, foram encontradas as concentrações de 7,89 mg/ml e 6,75 mg/ml, respectivamente.

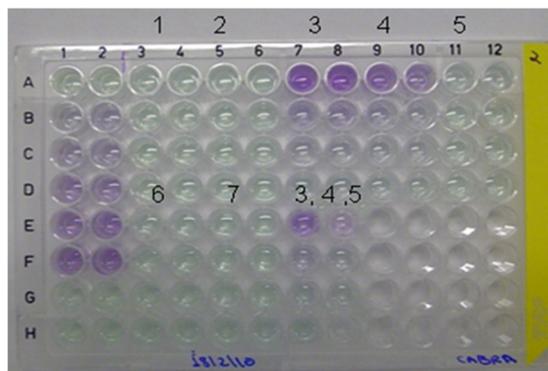


Figura 29 - Intensidade de proteínas utilizando o método do ácido biscinconínico. As colunas 7, 8, 9 e 10 mostram onde aconteceu a eluição e recuperação da IgG biotinizada de cabra.

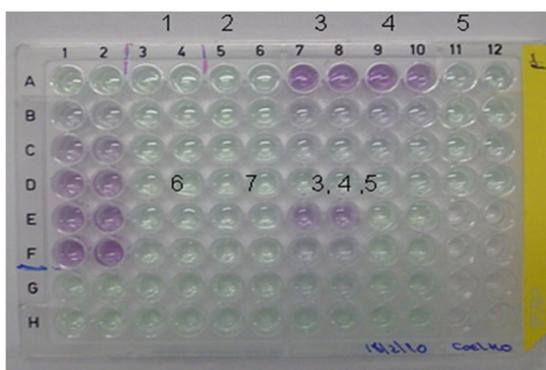


Figura 30 - Intensidade de proteínas utilizando o método do ácido biscinconínico. As colunas 7,8,9 e 10 mostram onde aconteceu a eluição e recuperação da IgG biotinizada de coelho.

6.2.6 Avaliação da especificidade da IgG marcada com biotina Anti-IgY de avestruzes frente a anticorpos de diferentes espécies animais

A especificidade dos anti-anticorpos marcados de coelho e cabra foi testada por ELISA contra soros de diferentes espécies de aves e mamíferos e répteis. Nas figuras 31 e 32 observa-se os resultados da utilização do anticorpo IgG anti-IgY produzido em coelhos e cabra, respectivamente, frente a diferentes soros de aves. Nota-se que, o soro de avestruz apresenta uma titulação em torno de 1:4.000, de ema, com título em aproximado de 1:2.000 e o de galinha, em torno de 1:1.000. O soro das outras duas aves (papagaio, ganso) assim como,

o soro de tartaruga, apresentam títulos menores. Nas figuras 33 e 34 observa-se os resultados da utilização do anticorpo IgG anti-IgY produzido em coelhos e cabra, respectivamente, frente a diferentes soros de mamíferos. Nota-se que, o soro de avestruz apresentou uma titulação próxima de 1:4.000. Nos soros de bovino, caprino, canino, e felinos não foram observados títulos frente aos anticorpos testados.

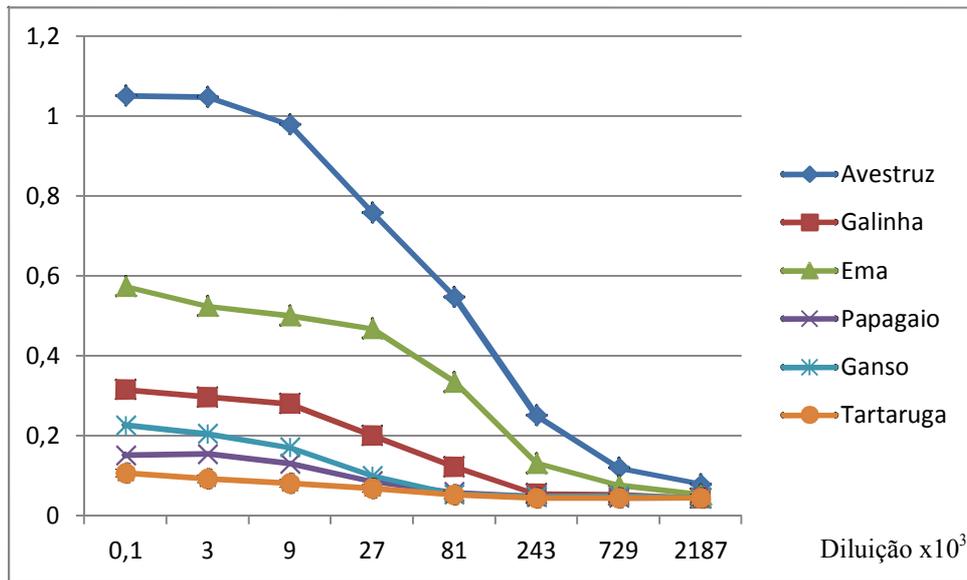


Figura 31 - Títulos por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em coelho frente a diferentes soros de aves e réptil.

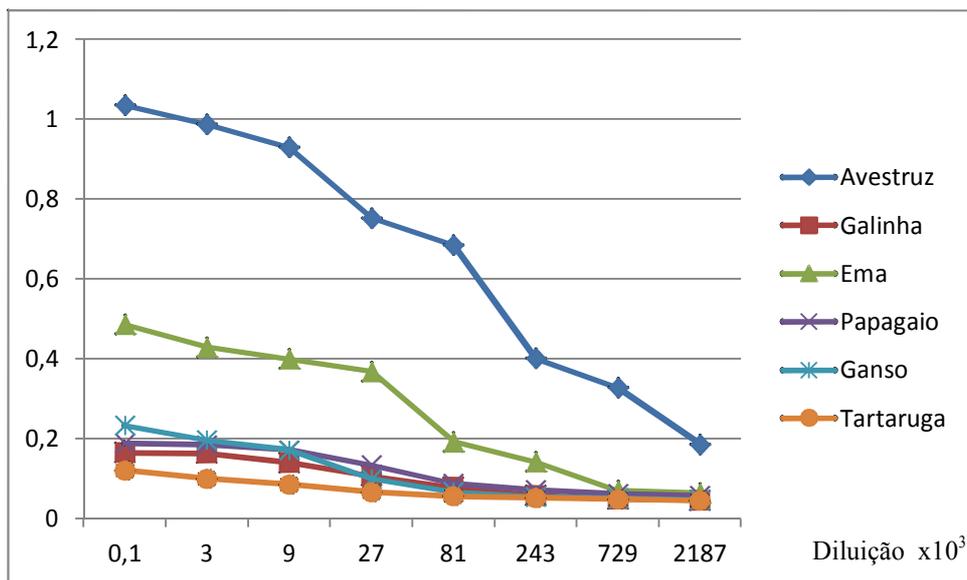


Figura 32 - Títulos por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em cabra frente a diferentes soros de aves e réptil.

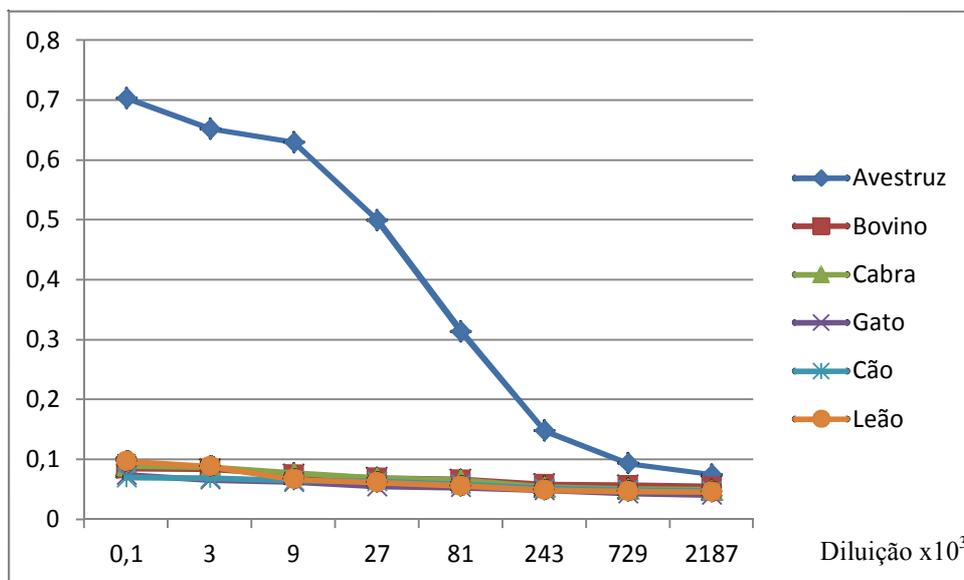


Figura 33 - Títulos por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em coelho frente a diferentes soros de mamíferos.

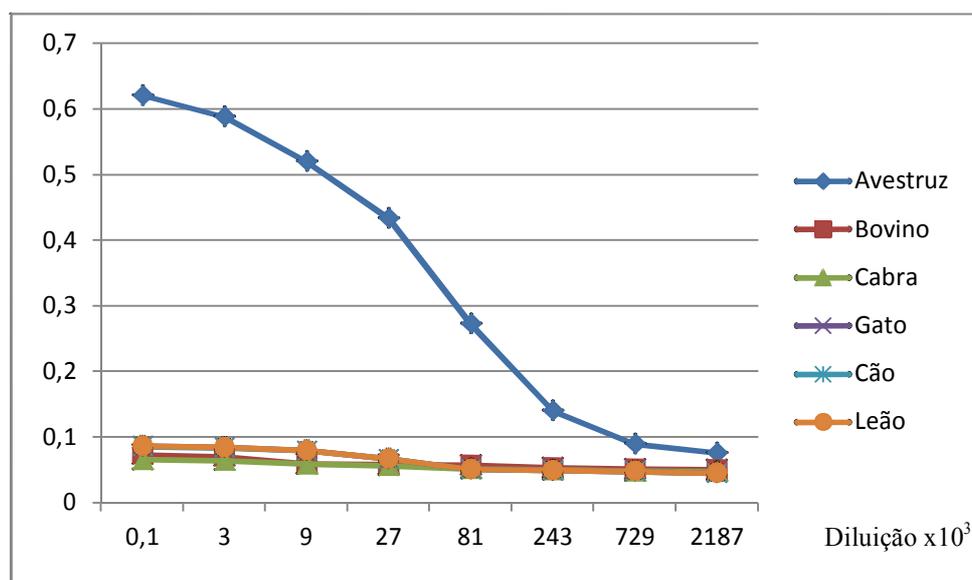


Figura 34 - Títulos por ELISA demonstrando a especificidade do anticorpo anti-IgY de avestruz produzido em cabra frente a diferentes soros de mamíferos.

6.3 Determinação da presença de cepas de *E. coli*, *E. fergusonii* e *S. aureus* isoladas de fezes de avestruzes (*Struthio camelus*) em criações dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo

6.3.1 Isolamento de *E. coli* e *E. fergusonii*

Cento e trinta e seis (136) isolados de *E. coli* e 04 de *E. fergusonii* foram selecionadas. Todas os isolados apresentaram crescimento em Agar McConkey e Agar BEM, apresentando um padrão de leitura aceitável e compatível nas provas do IMViC. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas utilizando testes miniaturizados (mini-Api /Biomérieux) e apresentaram padrão de identificação excelente conforme padrões de interpretação do kit.

6.3.1.1 Perfil de sensibilidade e resistência a antimicrobianos de isolados de *E. coli* e *E. fergusonii*

Dos 136 isolados de *E. coli* testados, 34 (25%) apresentaram resistência a pelo menos uma droga (intermediária ou resistente). Um isolado (0,73%) apresentou perfil de resistência intermediário a ciprofloxacina e um (0,73%) apresentou-se resistente ao mesmo antibiótico. Um (0,73%) intermediário e 14 (10,29%) resistentes a sulfazotrin, 2 (1,47%) resistentes a tobramicina, 10 (7,35%) intermediários e 3 (2,20%) resistentes a cefalotina, 2 (1,47%) resistentes a cefoxitina, 1 (0,73%) resistente a cloranfenicol, 1 (0,73%) resistente a gentamicina, 3 (2,20%) intermediários e 1 (0,73%) resistente a enrofloxacin, 4 (2,94%) intermediários e 20 (14,70%) resistentes tetraciclina, 6 (4,41%) intermediários e 8 (5,88%) resistentes a ampicilina, 1 (0,73%) resistente a amoxicilina e ácido clavulânico e todas as amostras sensíveis a cefotaxima. As demais amostras testadas apresentaram-se sensíveis aos demais antibióticos (Tabela 5, Anexo 5). Das amostras que apresentaram perfil de resistência, salienta-se que 04 (11,76%) isolados apresentaram resistência a 02 antibióticos, 05 (14,7%) isolados apresentaram resistência a 03 antibióticos e 02 (5,88%) isolados apresentaram resistência a 04 antibióticos simultaneamente. Das 04 amostras de *E. fergusonii*, somente uma mostrou perfil intermediário frente a enrofloxacin. As outras três amostras testadas apresentaram-se sensíveis aos demais antibióticos (Tabela 6, Anexo 5).

Tabela 5 - Resultado de antibiogramas de *E. coli* isoladas de avestruzes em propriedades dos estados Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Perfil	CIP	SUT	TOB	CFL	CFO	CLO	GEN	ENO	TET	AMP	AMC	CTX
Intermediária	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0	10 (7,3%)	0	0	0	3 (2,2%)	4 (2,9%)	6 (4,4%)	0	0
Resistente	1 (0,7%)	14 (10,3%)	2 (1,4%)	3 (2,2%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	20 (14,7%)	8 (5,9%)	1 (0,7%)	0
Sensível	134 (98,5%)	121 (88,9%)	134 (98,5%)	123 (90,4)	134 (98,5%)	135 (99,2%)	135 (99,2%)	132 (97,05%)	112 (82,3%)	122 (89,7%)	135 (99,2%)	136 (100%)
Total	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)	136 (100%)

Tabela 6 - Resultado de antibiogramas de cepas de *E. fergusonii* isoladas de avestruzes em propriedades dos estados Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Perfil	CIP	SUT	TOB	CFL	CFO	CLO	GEN	ENO	TET	AMP	AMC	CTX
Intermediária	0	0	0	0	0	0	01 (25%)	0	0	0	0	0
Resistente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sensível	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
Total	4 (100%)											

Legenda:

CIP – Ciprofloxacina
 SUT – Sulfazotrin
 TOB – Tobramicina
 CFL – Cefalotina
 CFO – Cefoxitina
 CLO – Cloranfenicol

GEN – Gentamicina
 ENO – Enrofloxacina
 TET- Tetraciclina
 AMP- Ampicilina
 AMC- Amoxicilina e ac. Clavulanico
 CTX- Cefotaxima

6.3.1.2 Análise molecular de isolados de *E. coli*

Os resultados a seguir, demonstram reações de PCR para a detecção do fator de virulência de *E. coli* enteropatogênicas típicas (EPEC) (gene estrutural para BfpA) em amostras de *E. coli*. Das cem (100) amostras testadas, 3 apresentaram fragmento amplificado, de tamanho esperado, de acordo com os oligonucleotídeos empregados (326 pb) (figura 35).

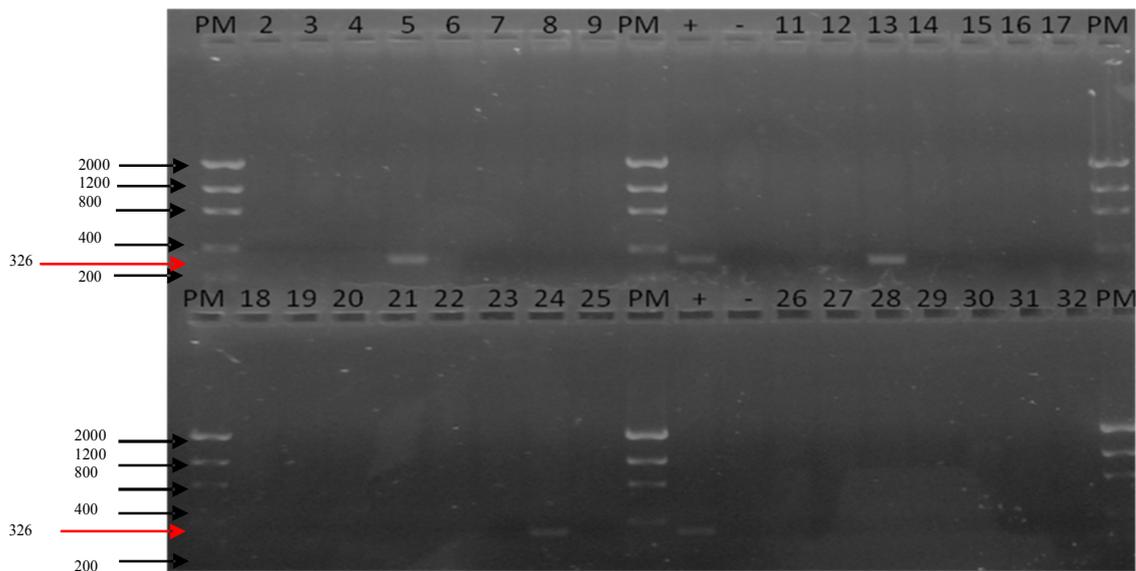


Figura 35 - Gel de agarose a 1% demonstrando produtos de PCR amplificados a partir do gene estrutural para BfpA. PM – Marcador DNA, Raias (+) - Controles positivos, Raias (-) - Controles negativos, Raias 5, 13 e 24 amostras amplificadas.

6.3.2 Isolamento de *S. aureus*

Doze amostras de *S.aureus* foram isoladas. Todos os isolados apresentaram crescimento em ágar sangue, com padrão de hemólise e pigmentação característica. Os isolados também apresentaram-se positivos ao teste da catalase em lâmina e coagulase em tubos. Posteriormente as amostras foram caracterizadas utilizando testes miniaturizados

(mini-api /Biomerieux) e apresentaram padrão de identificação excelente, conforme leitura e interpretação do kit.

6.3.2.1 Perfil de sensibilidade e resistência a antimicrobianos de isolados de *S. aureus*

As 12 amostras testadas apresentaram perfil de resistência a pelo menos uma droga (intermediária ou resistente). Nove amostras (75%) apresentaram perfil de resistência e 03 (25%), perfil de resistência intermediária à Amoxicilina, 02 (16,66%) amostras apresentaram perfil de resistência a ampicilina e todas (100%) as amostras apresentaram-se resistentes à penicilina. O restante das amostras testadas apresentaram-se sensíveis aos demais antibióticos (Tabela 7, Anexo 6).

Tabela 7 - Resultado de antibiogramas de isolados de *S. aureus* isoladas de avestruzes em propriedades dos estados Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Perfil	AMO	CLI	CFL	PEN	OXA	TET	AMP	ERI	SUL	GEN	CFO	VAN
Intermediária	03 (25%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistente	09 (75%)	0	0	0	0	0	02 (16,6%)	0	0	0	0	0
Sensível	0	12 (100%)	12 (100%)	0	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)
Total	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)						

Legenda:

AMO- Amoxicilina

CLI- Clindamicina

CFL- Cefalotina

PEN- Penicilina G

OXA- Oxacilina

TET- Tetraciclina

AMP- Ampicilina

ERI- Eritromicina

SUL- Sulfazotrim

GEN- Gentamicina

CFO- Cefoxitina

VAN- Vancomicina

7 DISCUSSÃO

Foram obtidos anticorpos provenientes de gemas de ovos de avestruzes hiperimunizadas, com quatro proteínas recombinantes e anticorpos anti-avestruz, em dois modelos animais, coelho e cabra. Em relação aos métodos de extração, os resultados obtidos com sulfato de amônia (S.A.) a 20% e sulfato de sódio (S.S) a 19% mostraram-se eficientes. As concentrações de IgY extraídas, por ambos os métodos, variaram entre 72,66 mg/ml a 316,49 mg/ml. Em galinhas são mencionadas concentrações de IgY, a partir de ovo que variam de 10 a 20 mg/ml, podendo-se encontrar de 100 a 400 mg/ml. Variação essa, associada com a raça, tamanho do ovo e variações fisiológicas individuais (AKITA e NAKAI 1993; MCLAREN et al., 1994; HASSL e ASPOCK 1988; CHACANA et al., 2004). Considerando o rendimento por ovo, deve-se salientar que, um ovo de avestruz pesa em média de 1,3 Kg a 1,5 Kg e contém em torno de 300 ml de gema. De acordo com Kornfeld et al. (2004), em condições aceitáveis, uma fêmea põe em média de 30 a 40 ovos, por ano, concentrados no período reprodutivo (de julho-agosto a dezembro-janeiro no Brasil). A fêmea, no pico de postura, irá produzir um ovo a cada dois dias. Numa estação de postura, uma fêmea poderá fazer uma postura de 15 a 70 ovos, variando de acordo com fatores individuais, qualidade genética, nutrição e potencial reprodutivo. Deste modo, segundo os nossos resultados, uma fêmea pode render até 21 litros de gema, o que poderia render até 66 g de IgY por estação de postura.

Na literatura, existem poucos dados sobre concentrações de IgY extraídas de ovos ou de soro de avestruzes. Cadman et al. (1994) descrevem a purificação de IgG de soro de avestruzes utilizando sulfato de amônia na concentração de 40%, porém, não menciona as concentrações encontradas. Estes autores descrevem que, a IgG de avestruz extraída do soro quando dissociada, apresenta uma massa molecular de 67,5 e 27 kDa para as cadeias pesada e leve, respectivamente. Em outro estudo realizado, com gemas de ovos de avestruzes, os autores descrevem que, o peso molecular das cadeias leves e pesadas da IgY gira em torno de 64 kDa e 28 kDa, respectivamente (ADACHI et al., 2008). Em nossa pesquisa, os números encontrados para IgY, extraída da gema dos ovos de avestruzes quando dissociada apresentou uma banda de aproximadamente 66 kDa e outra de 25 kDa. A diferença no tamanho das bandas pode estar relacionada com o tipo de extração e material utilizados, gema do ovo ou soro sanguíneo.

Com relação ao esquema de imunização, em avestruzes Adachi et al. (2008) descrevem a imunização via intra-muscular na região lombar das aves. No estudo, os autores citam a administração de 30 a 50 µg/ave de hemaglutinina (HA) do vírus H5N1 emulsificada em Ajuvante Completo de Freund's. Os resultados encontrados sugerem que, a dose administrada foi suficiente para alcançar altos títulos contra HA no soro e na gema das aves. Prosseguindo na pesquisa com o vírus H5N1 de influenza aviária, Kamiyama et al. (2011), utilizaram concentrações de IgY anti-HA que variaram entre 6,7 e 384 µg/ml para inibição de replicação do vírus em células MDCK. Em nosso estudo, o esquema de imunização das avestruzes com proteínas recombinantes (200 µg por imunização) contendo adjuvante completo de Freund (AFC) em intervalos de 21 dias, foi capaz de induzir uma resposta imune com níveis elevados de anticorpos. Estes resultados confirmam que, a utilização de avestruzes como animais de grande importância na produção de anticorpos, transferem altas concentrações de IgY para as gemas.

Comparativamente, os estudos de Carlander et al. (1999) com IgY de galinha, os resultados apresentados corroboram e mostram que diferentes antígenos podem estimular a produção de elevadas concentrações de IgY específicas na gema. Outra vantagem observada neste estudo, é a possível utilização de ovos não galados para a extração de IgY, o que não interferiria, portanto, no sistema de produção da fazenda produtora. Ao contrário, poderia representar uma fonte alternativa agregada à cadeia produtiva na estruicultura.

As informações relacionadas ao diagnóstico de doenças infecto-contagiosas em avestruzes, têm se mostrado restritas e escassas. Em kits comerciais existentes para detectar as doenças nestas aves, são utilizados anticorpos anti-galinha que são considerados de menor especificidade ou não reagem com anticorpos de avestruzes. Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstram que, a produção em cabras e coelhos de um conjugado anti-avestruz marcado com biotina, apresentam maior avidéz com soros de avestruz e ema e em menor grau com as outras aves testadas, inclusive, frente ao soro de galinha. Por outro lado, nenhum soro das espécies de mamíferos testadas apresentou reação frente ao conjugado anti-avestruz, desenvolvido neste trabalho. Cadman et al.(1994), descrevem a ausência de reatividade entre IgY de avestruzes contra anticorpos monoclonais e policlonais de diferentes espécies de animais, incluindo bovino, gato, cão, equino e galinha. Neste sentido, os autores sugerem que a utilização de imunoglobulinas específicas de avestruzes devem ser utilizadas em testes de diagnóstico. Apesar da prova de inibição da hemaglutinação ser considerada teste oficial para algumas doenças em avestruzes, o ELISA tem sido cada vez mais utilizado, devido a sua maior especificidade e sensibilidade (WILLIAMS et al., 1997). Estudos conduzidos por

Fernandes et al. (2010) corroboram com as afirmações de que os kits comerciais são produzidos para uso específico em galinhas, portanto, com pouca especificidade para outras espécies. Nesse sentido, a produção de conjugado anti-IgY de avestruz para utilização em kits comerciais, com reprodutibilidade, torna-se uma alternativa indispensável para estudos soropidemiológicos e para programas de defesa animal.

Na avaliação da atividade de inibição ($p < 0,05$) do crescimento de anticorpos IgY, obtidas pelos dois métodos de extração descritos sobre as cepas bacterianas, os resultados obtidos utilizando-se a concentração de 1,8 $\mu\text{g/ml}$ de IgY não mostraram diferenças significativas entre si. Por outro lado, os resultados demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e o controle. Resultados semelhantes aos aqui apresentados, utilizando IgY policlonais obtidos de avestruz em experimento de inibição de *S. aureus* e *E. coli*, ainda não estão disponíveis na literatura atual. Porém, resultados de inibição de crescimento de *S. aureus* e *E. coli* com concentrações baixas, como as utilizadas em nosso estudo, já foram descritos por alguns autores, utilizando IgY extraídos de galinha, tanto in vivo quanto in vitro. Guimarães et al. (2009), por exemplo, afirmam que, a inibição do crescimento de *S. aureus* foi eficiente quando utilizadas IgYs específicas, nas concentrações de 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$. Segundo os autores, a função bacteriostática da IgY é devido à interação da mesma com componentes da superfície do *S. aureus*. Sunwoo et al. (2002) descrevem a habilidade de inibição da IgY de galinha sobre a *E. coli* O157:H7. No estudo, os autores explicam que a função antibacteriana da IgY parece resultar de interação com componentes da superfície da bactéria, comprovada através de imunofluorescência e microscopia eletrônica. Zhen et al. (2008, 2009) descrevem, igualmente, a atividade inibitória da IgY produzida em galinhas contra *E. coli* e *S. aureus*, ambas isoladas de mastite bovina, e sugerem que, IgY produzidas com antígenos específicos apresentam um grande potencial terapêutico para vacas com mastites. Em outro estudo, Mahdavi et al. (2010) também compararam o efeito inibidor da IgY extraída da gema de galinhas contra *E. coli* O78:K80, considerada uma das grandes causadoras de doenças septicêmicas em galinhas e utilizou estes anticorpos na ração das aves, conferindo proteção aos animais tratados. De acordo com os autores, estes anticorpos poderiam ser aplicados contra infecções gastrointestinais, causadas por *E. coli* em outros animais de produção. Em outros experimentos, leitões e bezerros foram tratados com IgY contra doenças entéricas causadas por cepas de *E. coli* K88, K99, 987P, com resultados promissores, segundo os autores (MINE e KOVACS-NOLAN, 2002). Ribeiro et al. (2007) descrevem o fornecimento de gema de ovos de galinha hiperimunizadas contra *E. coli* patogênica para suínos, avaliando a imunidade passiva de leitões recém-nascidos. Os

resultados do estudo sugerem que, gemas de aves hiperimunizadas agem efetivamente na prevenção da diarreia dos leitões e seu uso contínuo é mais vantajoso que o fornecimento somente ao nascer. Marquardt et al. (1999) induziram diarreia em leitões de 3 a 21 dias de vida e em leitões recém-desmamados, utilizando a cepa K88+ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). Os resultados obtidos demonstraram que, após o tratamento com gemas contendo IgY anti-K88+, apresentaram melhora nos sinais clínicos. Amaral et al. (2008) verificaram em seu trabalho, que a IgY produzida em galinhas com antígenos de EPEC 0111, STEC 0111 e STEC 0157 teria habilidade “in vitro” e atividade biológica sobre estas três cepas bacterianas. Seus resultados mostraram-se efetivos quanto à atividade biológica “in vitro”, reforçando a alternativa de uso profilático ou tratamento de doenças causadas por estes micro-organismos com a IgY específica. Almeida et al. (2003), observaram o bloqueio de IgY de galinhas contra *E. coli* (EPEC) em aderir as células HeLa. Sugeriram o seu uso, como ferramenta na identificação e seu possível uso no diagnóstico de doenças causadas pela bactéria. Sugita e Konishi (1996) testaram IgY desenvolvidas em galinhas contra *S. aureus* enterotoxigênicos e observaram a inibição do crescimento das bactérias in vitro. Resultados semelhantes contra *S. aureus* de diferentes origens, entre elas LSA88 enterotoxigênica de origem bovina, foram observados por Vieira-da-Motta et al. (2001), ao testarem a inibição de crescimento e a produção de enterotoxina por *S. aureus* ATCC e LSA88 in vitro (VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2001a).

Quanto ao perfil de resistência frente aos antimicrobianos testados, das 136 amostras de *E. coli* testadas, 34 (25%) apresentaram resistência a pelo menos uma droga (intermediária ou resistente). Uma amostra (0,73%) apresentou perfil de resistência intermediária a ciprofloxacina e uma (0,73%) apresentou-se resistente ao mesmo antibiótico. Uma (0,73%) intermediária e 14 (10,29%) resistentes à sulfazotrin, 2 (1,47%) resistentes à tobramicina, 10 (7,35%) intermediárias e 3 (2,20%) resistentes à cefalotina, 2 (1,47%) resistentes à cefoxitina, 1 (0,73%) resistente à cloranfenicol e à gentamicina, 3 (2,20%) intermediárias e 1 (0,73%) resistente à enrofloxacin, 4 (2,94%) intermediárias e 20 (14,70%) resistentes tetraciclina, 6 (4,41%) intermediárias e 8 (5,88%) resistentes à ampicilina, 1 (0,73%) resistente à amoxicilina e ácido clavulânico e todas as amostras sensíveis à cefotaxima. O restante das amostras testadas apresentaram-se sensíveis aos demais antibióticos (tabela 4). Das amostras que apresentaram perfil de resistência salienta-se que, 4 (11,76%) cepas apresentaram resistência a 2 antibióticos, 5 (14,7%) isolados apresentaram resistência à 3 antibióticos e 2 (5,88%) amostras apresentaram resistência à 4 antibióticos, simultaneamente. As 12 amostras de *S. aureus* testadas apresentaram perfil de resistência a pelo menos uma droga

(intermediária ou resistente). Nove (75%) amostras apresentaram perfil de resistência e 3 (25%) perfil de resistência intermediária à Amoxicilina, 2 (16,66%) amostras apresentaram perfil de resistência à ampicilina e todas (100%) amostras apresentaram-se resistentes à penicilina. O restante das amostras testadas apresentaram-se sensíveis aos demais antibióticos (tabela 5).

O isolamento de amostras de *E. fergusonii*, classificadas por kit miniaturizado, utilizado neste trabalho, também merece atenção na rotina laboratorial veterinária, uma vez que, a bioquímica convencional classificaria estas bactérias como *E. coli*. Amostras desta bactéria foram isoladas na propriedade de S. F. de Itabapoana. *E. fergusonii* foi isolada anteriormente em avestruzes em outros criatórios fora do Brasil e são incriminadas em diarreia com fibrino –necrose na mucosa cecal destas aves (HERRÁEZ, et al., 2005). Neste trabalho, cinco dos animais, de onde foram isoladas *E. fergusonii*, apresentavam diarreia profusa que chamava a atenção nas observações na referida propriedade. Entre as bactérias isoladas apenas uma delas apresentou perfil de resistência intermediária à enrofloxacin. Rayamajhi et al. (2011) mostraram a importância de *E. fergusonii*, como um patógeno potencial, de caráter zoonótico, após investigação de genes de resistência a drogas em bactérias isoladas, em animais de produção (suínos e frangos) provenientes de propriedades rurais, na Coreia do Sul. Em rebanho caprino com animais apresentando diarreia, foi isolada *E. fergusonii* de fezes e de órgãos, como intestino, pulmão, fígado e rim (HARIHARAN et al., 2007). Este patógeno também pode estar envolvido em casos graves de doenças em humanos, como causa de cistite aguda, causada por cepa multirresistente (SAVINI et al., 2008).

A transferência gênica, como genes de resistência a drogas, entre bactérias do solo é um fato e é atribuída ao uso indiscriminado de drogas antibacterianas (SCHAUSS et al., 2009; HEUER et al., 2010). O perfil de resistência aos antimicrobianos apresentou variações nas diferentes propriedades estudadas. Das três propriedades estudadas, duas mantinham criação mista de animais. Na propriedade localizada em São Francisco do Itabapoana, além de avestruzes, um rebanho de ovinos e eqüinos de trabalho eram criados em conjunto e soltos no mesmo pasto. Na propriedade localizada em Guaparari, além de avestruzes, um rebanho de bovinos e equinos, para fins de reprodução, eram criados na mesma propriedade, porém os animais não eram criados em conjunto. Salienta-se ainda que, estas duas propriedades eram utilizadas como fazenda de produção de leite, fato este que, sugere o perfil de resistência a drogas mais elevado pelas bactérias identificadas, quando comparado com a propriedade que não teve tal atividade anteriormente. O perfil de resistência pode ser explicado, pela possível presença de microbiota do solo, por uso de antimicrobianos no tratamento contra doenças

bacterianas nos animais. Somente, a propriedade localizada em Saquarema criava apenas avestruzes e informou que, obedeceu à aplicação do intervalo sanitário (90 dias) da terra preconizado pelo Ministério da Agricultura, antes da introdução de nova atividade pecuária.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas apresentaram resistência contra várias drogas, cujos resultados puderam ser comparados aos de outros autores que, descrevem a transmissão destes agentes entre animais e seus proprietários (WEESE et al., 2006; VAN DUIJKEREN et al., 2008). De acordo com o perfil das bactérias frente aos diversos antibióticos, pode-se inferir que, há probabilidade de riscos para as pessoas e diferentes espécies animais das propriedades estudadas neste trabalho. Vários autores relatam a relação entre os antibióticos usados em animais e o aparecimento de resistências em cepas bacterianas de importância em afecções humanas e em animais (MACEDO et al., 2007; POETA e RODRIGUES, 2008). Em uma propriedade de Campos dos Goytacazes-RJ, várias espécies bacterianas foram identificadas e incriminadas como possíveis causadoras de óbitos, na fase inicial de vida em um criatório de avestruzes, porém sem a investigação do perfil antimicrobiano das mesmas, prevalecendo o isolamento de *E. coli* (VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2008). Embora, neste trabalho os resultados de isolamento de 12 cepas de *S. aureus* de suabe de cloaca possa indicar baixa ocorrência da bactéria nestas aves, tal como o observado em ovos de 387 aves por Cabassi et al. (2004), os dados de mortalidade embrionária de avestruzes, publicados por Jahantigh (2010), apontam em direção contrária, incriminando *Staphylococcus* spp como causador de 25% dos embriões em 100 ovos estudados. Apenas três cepas de *S. aureus* resistentes às drogas foram isoladas de avestruzes adultos, colonizados na cloaca, em uma propriedade de Campos dos Goytacazes (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

O diagnóstico por PCR em pesquisas de doenças infecto-contagiosas em avestruzes ainda é escasso, na literatura atual. Eisenberg et al. (2003) descreveram a ocorrência de circovirose em tecido hepático, embrionário e em ovos de avestruzes, para casos de mortalidade de aves jovens, sem sintomas específicos e definidos. A PCR para detecção de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) tem sido utilizada em trabalhos de pesquisa como método rápido, de alta sensibilidade e especificidade. Esta técnica contribui para a identificação da presença dos principais genes de virulência da EPEC. As cem (100) amostras, que foram identificadas como *E. coli* por testes bioquímicos, foram submetidas a PCR utilizando primer específico para BfpA. Das cem amostras, três delas, foram amplificadas com tamanho do fragmento correspondendo a 326 pb, correspondente ao de BfpA. Estas amostras foram isoladas na propriedade de Guarapari, que já desenvolveu atividade pecuária de gado de leite anteriormente. Cepas de EPEC isoladas em bovinos podem representar riscos a pessoas que

possam de alguma forma, entrar em contato com material fecal ou contaminado com fezes dessa espécie animal (Cookson et al., 2006). O consumo de carne de origem animal, com baixa qualidade higiênica, por manipulação humana ou de outras origens, tem causado prejuízos na área de saúde pública, em particular, nos países de terceiro mundo (SILVA et al., 2001; TODD et al., 2007). Nos estados americanos de Ohio e Indiana, EUA, foi demonstrada a presença de *E. coli* em 19% das carcaças destinadas ao consumo humano, caracterizando, portanto, um problema de saúde pública (Ley et al., 2001). Tendo em vista, o isolamento e identificação molecular de cepas patogênicas de *E. coli* em uma das propriedades estudadas, esta investigação traz à luz, pela primeira vez no país, a possibilidade de contaminação de carcaças de avestruzes por manipulação humana. Se faz necessária, portanto, maiores investigações para a presença desta bactéria e de outros agentes patogênicos, em outras propriedades destinadas ao comércio de carne de avestruzes.

8 CONCLUSÕES

- A extração de IgY de ovos de avestruzes, por sulfato de amônia a 20% e sulfato de sódio a 19 % , rendeu concentrações semelhantes e elevadas de anticorpos IgY;
- Os anticorpos IgY anti SECrec e RAPrec extraídos de gemas de avestruzes imunizados, foram capazes de inibir significativamente, o crescimento de *S. aureus* de diferentes origens *in vitro*;
- Os anticorpos IgY anti EspBrec e BFPArec, extraídos de gemas de avestruzes imunizados, foram capazes de inibir significativamente, o crescimento de *E. coli in vitro*;
- Anticorpos policlonais IgY, produzidos e extraídos de gemas de avestruzes, apresentam um grande potencial para a utilização como imunoterápico e ferramenta para imunodiagnóstico de avestruzes;
- Os anticorpos IgG biotinizados anti-IgY de avestruzes, produzidos em coelhos e cabra, apresentaram especificidade para o reconhecimento de anticorpos de avestruzes superior ao de anti-galinha comercial, desenvolvido em cabra;
- A presença e a multirresistência a drogas de isolados de *S. aureus* e *E. coli* evidencia risco na possível transmissão para humanos e outras espécies animais;
- A presença de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) foi caracterizada através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), em 3% das amostras testadas, e evidencia possível transmissão para humanos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K.; HANDHARYANI, E.; SARI, D.; TAKAMA, K.; FUKUDA, K.; ENDO, I.; YAMAMOTO, I.; SAWA, M.; TANAKA, M.; KONISHI, I.; TSUKAMOTO, Y. Development of neutralization antibodies against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus using ostrich (*Struthio camelus*) yolk. **Mol. Med. Rep.**, v. 1, p. 203-209, 2008.

AIRES-DE-SOUZA, M.; PARENTE, C.E.S.R.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I.C.F.; SILVA, D. A.; LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo, bovine, ovine, and milk samples from Rio de Janeiro State, Brazil. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 73, p. 3845-3849, 2007.

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. **J. Immunol. Meth.**, v. 60, p. 207-214, 1993.

ALMEIDA, C.M.C; QUINTANA-FLORES, V.M.; MEDINA-ACOSTA, E.; SCHRIEFER, A., BARRAL-NETTO; DIAS DA SILVA, W. Egg Yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. **Scand. J. Immunol.**, v. 57, p. 573-582, 2003.

ALMEIDA, C.M.K.; KANASHIRO, M.M.; RANGEL FILHO, F.B.; MATTA, M.R.F.; KIPNIS, T.L.; SILVA, W.D. DA . Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **Vet. Rec.**, v. 143, p. 579-584, 1998.

ALMEIDA, R.M.A.; DEL BIANCHI, M.; NETO, M.C.G.; SOUZA, R.R; CAMPOS, W.R. Microbiota da orofaringe e fezes de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios: estudos preliminares. **Bol. Med. Vet.** – UNIPINHAL – Espírito Santo do Pinhal - SP, v. 01, n. 01, p. 49-56, 2005.

AMARAL, J.A.; FRANCO, M.T.; QUINTANILLA, L.Z.; 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. **Vet. Res. Commun**, v. 32, p. 281-290, 2008.

AMISANO, G.; FORNASERO, S.; MIGLIARETTI, G.; CARMELLO, S.; TARASCO, V.; SAVINO, F. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. **New Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 45-51, 2011.

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. **FEMS Microbiol Lett**, v. 267, p. 145–150, 2007.

ARCHER, G.L. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1179-1181, 1998.

ARMAND-LEFEVRE, L., RUIMY, R., ANDREMONT, A., Clonal Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Healthy Pig Farmers, Human Controls, and Pigs, **Em. Infect. Dis.**, v. 11, n. 5, p. 711-714. 2005.

BLACK, J. G. - **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 370-419.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA. A.; BLANCO, J. Productions of toxins (Enterotoxins, Verotoxins, and Necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemia and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity. **J. Clin. Microbiol.**, p. 2953-2957, 1997.

BRUNDA, G.; SASHIDHAR, R.B.; SARIN, R.K. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of India cobra (*Naja naja naja*) venom in biological samples of forensic origin. **Toxicon**, v. 48, p. 183-194, 2006.

CABASSI, C.S.; TADDEI, S.; PREDARI, G.; GALVANI, G.; GHIDINI, F.; SCHIANO, E.; CAVIRANI, S. Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failure. **Avian Dis.**, v. 48, n. 3, p. 716-722, 2004.

CADMAN, H.F.; KELLY, P.J.; DIKANIFURA, M.; CARTER, S.D.; AZWAI, S.M.; WRIGHT, P. Isolation and characterization of serum immunoglobulin classes of the ostrich (*Struthio camelus*). **Avian Dis.**, v. 38, p. 616-620, 1994.

CARLANDER, D.; STALBERG, D.; LARSSON, A. Chicken antibodies. A Clinical Chemistry Perspective. **Upsala J. Med. Sci.**, v. 104, p. 179-190, 1999.

CARNEIRO, L.A.M.; LINS, M.C.; GARCIA, F.R.A. Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 108, n. 1, p. 15-21, 2006.

CARNEIRO, C.; ARAÚJO, C.; GONÇALVES, A.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; RUIZ, E.; ULİYAKINA, I.; RODRIGUES, J.; IGREJAS, G.; POETA, P.; 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.**, v. 7, n. 8, p. 991-994, 2010.

CARRER C. C.; ELMOR A. R.; KORNFELD E. M.; CARVALHO C. M. **A Criação do Avestruz Guia Completo de A a Z**. Pirassununga, SP: Grupo Ostrich do Brasil, p. 13-16, 2004.

CASADEVALL, A. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. **Em. Inf. Dis.**, v. 2, p. 200-208, 1996.

CHACANA, P. A.; TERZOLO H.R.; GUTIÉRREZ CALZADO, E.; SCHADE R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Rev. Med. Vet.**, v. 85, n. 5, p. 179-189, 2004.

CHALGHOUMI, R.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Sci**, v. 87, p. 32-40, 2008.

COOKSON, A. L.; TAYLOR, S. C.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F. Attwood, G. T. Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v. 54, n. 2, p. 78-84. 2006.

CRAY, C.; VILLAR, D. Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. **Vet. Clin. Path.**, v. 37, n. 3, p. 328-331, 2008.

CRISTE, A.; GEORGESCU, B.; CRISTE, F.; BOARU, A.; NEGREA, O. The use of the anti-venom specific antibodies isolated from duck eggs for inactivation of the viper venom. **Zootehnie si Biotehnologii**, v. 41, n. 1, p. 49-52, 2008.

DEDEIĆ-LIUBOVIĆ, A.; HUKIĆ, M.; BEKIĆ, D.; ZVIZDIĆ, A. Frequency and distribution of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with diarrhoea in Bosnia and Herzegovina. **Bosn. J. Basic. Med. Sci.**, v. 9, n. 2, p. 148-55, 2009.

de PAULA, V.S.; SILVA, A.S.; VASCONCELOS, G.A.L.B.M.; 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. **J. Virol. Methods.**, v. 171, n. 1, p. 102-106, 2011.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, **Clin. Microbiol. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

EISENBERG, S.W.; VAN ASTEN, A.J.; VAN EDEREN, A.M.; DORRESTEIN, G.M. Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on a farm in The Netherlands. **Vet. Microbiol.**, v. 95, p. 27-38, 2003.

ELMÔR, R.A.; BARBOSA, F.W.; CARVALHO, P.C. Manejo Sanitário e Doenças. In: CARRER C. C.; ELMOR A. R.; KORNFELD E. M.; CARVALHO C. M. **A Criação do Avestruz Guia Completo de A a Z**. Pirassununga, SP: Grupo Ostrich do Brasil, p. 13-16, 2004.

ESMERINO, L.A.; GONÇALVES, L.G.; SCHELESKY, M.E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2003.

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. Soroepidemiologia da doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados da Bahia e de São Paulo. **Cienc. Rural**, v. 40, n. 1, p. 135-140, 2010.

FLORES, V.M.Q.; FERNANDES, R.C.C.; MACEDO, Z.S.; MEDINA-ACOSTA, E. Expression and purification of the recombinant enteropathogenic *Escherichia coli* Vaccine candidates BfpA and EspB. **Protein Exp. Purif.**, v. 25, p. 16-22, 2002.

FREIRE, R.B.; FREIRE, M.F.I.; BERBARA, R.L. Elisa de captura IgY para quantificação de acetate de lupeol em *Verninia scorpioides* lam. Pers (asteracea). **Cienc. Rural**, v. 34, n. 4, p. 1069-1074, 2004.

GIANNONI L. M. **Avestruz Reprodução Cria e Recria**. Viçosa, MG: CPT, p. 13- 23, 2002.

GIANNONI L. M. Perspectivas da criação de avestruzes no Brasil. **In**: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia (SBZ, 41a, Campo Grande, MS, 19 a 22 de julho 2004, Anais eletrônicos. Campo Grande: SBZ, 2004.

GUIMARÃES, M.C.C.; AMARAL, L.G.; RANGEL, L.B.A.; SILVA, I.V.; MATTA, C.G.F.; MATTA, M.F.R. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies, **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 57, p. 377-382, 2009.

HARIHARAN, H.; LÓPEZ, A.; CONBOY, G.; COLES, M.; MUIRHEAD, T. Isolation of *Escherichia fergusonii* from the feces and internal organs of goat with diarrhea. **Can. Vet. J.**, v. 48, p. 630-631, 2007.

HATTA, H.; K. TSUDA; S. AKACHI; M. KIM; YAMAMOTA, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscienc. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 450-456, 1993.

HERRÁEZ, P.; RODRIGUEZ, F.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; ACOSTA, B.; JABER, J.R.; CASTELLANO, J.; CASTRO, A. Fibrino-necrotic typhlitis caused by *Escherichia fergusonii* in ostriches (*Struthio camelus*). **Avian Dis.**, v. 49, p. 167-169, 2005.

HEUER, H.; BINH, C.T.T.; KOPMANN, C.; ZIMMERLING, U.; KROGERRECKLENFORT, E.; SMALLA, K. Effects of Veterinary Medicines introduced via manure into soil on microbial communities. **Interd. Stud. Envir. Chem.**, p. 9-13, 2010.

HINTON, M. HEDGES, A.J.; LINTON, A.H. The ecology of *Escherichia coli* in market calves fed a milk-substitute diet. **J. Ap. Bacteriol.**, v. 58, p. 27-35, 1985.

HIRSH, D.C; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, p. 446, 2003.

HORIE, K.; HORIE, N.; ABDU, A.M. et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. **J. Dairy Sci.** v. 87, p. 4073-4079, 2004.

HOSKEN M. F; SILVEIRA da C. A. **Criação de Avestruz**. Viçosa, MG: Editora Aprenda Fácil, p. 19, 2001.

JAHANTIGH, M. Bacteriological study of dead-in-shell embryos of ostrich. **Iran. J. Vet. Res.**, Shiraz University., v. 11, n.1, Ser. 30, p.88-90, 2010.

KAPER, J.B. Defining EPEC. Proceedings of the international Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

KARLSSON, M.; LARSSON, A.; KOLLBERG, H. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poult. Sci. J. Champaign**, v. 60, p. 341-348, 2004.

KAMIYAMA, Y.; ADACHI, K.; HANDHARYANI, E.; SOEJOEDONO, R.D.; KUSANO, T.; INAI, M.; TSUKAMOTO, M.; KASHIWAGI, S.; TSUKAMOTO, Y. Protection from avian influenza H5N1 virus infection with antibody-impregnated filters. **Virol. J.**, v. 8, n. 54, p. 1-3, 2011.

KARAMA, M.; DE JESUS, A.E.; VEARY, C.M. Microbial Quality of Ostrich Carcasses Produced at an Export-Approved South African Abattoir. **J. Food Prot.**, v. 66, n. 5, p.878-881, 2003.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.A.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 1465, 2001.

KORNFELD, M.E.; ELMÔR, R.A.; BARBOSA, F.W. Manejo Reprodutivo. In: CARRER C. C.; ELMOR A. R.; KORNFELD E. M.; CARVALHO C. M. **A Criação do Avestruz Guia Completo de A a Z**. Pirassununga, SP: Grupo Ostrich do Brasil, p. 13-16, 2004.

KOREM, M.; SHEORAN, A.S.; GOV, Y.; TZIPORI, S.; BOROVOK, I.; BALABAN, N. Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Letters** v.223, p.167-175, 2003.

KOVACS-NOLAN, J.K.; MINE, Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. **J. Immunol. Meth.**, v. 296, p. 199-209, 2005.

KWEON, C.; KWON, B.; WOO, S.; KIM, J.; WOO, G.; SON, D.; HUR, W.; LEE, Y. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) in piglets. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 62, n. 9, p. 961-964, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 386-396, 1970.

LAMARCHE, M.G.; DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F.; CAZA, M.; CURTIS WHITE, D.G.; DHO-MOULIN, M.; WILSON, R.A.; WHITTAM, T.S. III, R.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4138-4145, 2005.

LARSSON, A.; WEJAKER, P.; FORSBERG, P.; LINDAHL, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **J. Immunol. Meth.**, n. 156, p. 79-83, 1992.

LEE, D.Y.; CHO, Y.W.; KANG, S.G.; SHIN, S.J.; YOO, H.S. Development of a novel antigen capture ELISA using IgY against porcine interleukin-6 and its application. **J. Vet. Sci.**, v. 5, n. 4, p. 337-343, 2005.

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*. **Poult. Sci.**, v. 81, n. 5, p. 632-41, 2002.

LEY, E.C.; MORISHITA, T.Y.; BRISKER, T.; HARR, B.S. Prevalence of Salmonella, Campylobacter, and Escherichia coli on ostrich carcasses and the susceptibility of ostrich-origin E. coli isolates to various antibiotics. **Avian Dis.**, v. 45, n. 3, p. 696-700, 2001.

LIM, S.; JOO, Y.; MOON, J.; LEE, A.; NAM, H.; WEE, S.; KOH, H. Molecular typing of enterotoxigenic *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 66, n. 5, p. 581-584, 2004.

LU, Y.; LIU, J.; JIN, L.; LI, X.; ZHEN, Y.H.; XUE, H.; YOU, J.; XU, Y. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 25, p. 604-610, 2008.

MA, S.; ZHANG, Y. Preparation of immunoglobulin Y (IgY) against lipopolysaccharide using gel chromatography from the yolks of eggs laid by immunized hens. **Protein J.**, v. 29, n. 7, p. 475-80, 2010.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R.M.C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, p. 1117-1123, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganism**. 8.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997, 986p.

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. **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 9, n. 2, p. 366-373, 2010.

MAHDAVI, A.H.; RAHMANI, H.R.; NILI, N.; SAMIE, A.H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; JAHANIAN, R. Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia coli* colonization, and immunocompetence of challenged broiler chicks. **Poultry Sci.**, v. 89, p. 484-494, 2010.

MALIK, M.W.; AYUB, N.; QURESHI, I.Z. Passive immunization using purified IgYs against infectious bursal disease of chickens in Pakistan. **J.Vet.Sci.**, v. 7, n. 1, p. 43-46, 2006.

MARINHO, M.; MEIRELES, M.V.; SOUZA, A.V.G. Determinação da microflora do trato gastrointestinal de avestruz (*Struthio camelus*) criados na região noroeste do estado de São Paulo, submetidos à necropsia. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, p. 267-271, 2004.

MARQUARDT, R. R.; JIN, L. Z.; KIM, J.; FANG, L.; FROHLICH, A. A.; BAIDOO, S. K. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, v. 23, p. 283-288, 1999.

MAYO, S.; CARLSSON, H.E.; ZAGON, A.; ROYO, F.; HAU, J. Enhancement of anamnestic immunospecific antibody response in orally immunized chickens. **J. Immun. Meth.**, p. 1-6, 2008.

MCLAREN, R.D.; PROSSER, C.G.; GRIEVE, R.C.J.; BORISSENKO, M. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chicken immunized with ovine α -lactoalbumin. **J. Immun. Meth.**, v. 177, p. 175-184, 1994.

MELVILLE, P.A.; COGLIATI, B.; MANGIATERRA, M.B.B.C.D.; PERES, M.R.; MOURA, S.C.A.; MATSUDA, L.; KIM, A.; BENITES, N.R. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruz (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. **Cienc. Rural**, v. 34, n. 6, p. 1871-1876, 2004.

MINE Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteroinfectious disease: a review. **J. Med. Food**, v. 5, p. 159-160, 2002.

MOREIRA, D.D.O.; MORAIS, V.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; CAMPOS FARINHA, A. E. C.; TONHASCA JR, A. Ants as Carriers of Antibiotic-Resistant Bacteria in Hospitals. **Neotrop. Entomol.**, v. 34 n. 6, p. 999-1006, 2005.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **J. Antim. Chemoth.**, v. 62, n. 6, p. 1181-1187. 2008.

MUNIZ R. L. **Revista Struthio & Cultura**. São Paulo, SP: Editora RPM em associação com a empresa Ave Struthio, Ano III, n.11 p. 18-19, 2004.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; STEHLING, M.B.; SILVEIRA, W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 7, n. 29, p. 479-486, 2009.

NARDI, A.R.M.; SALVADORI, M.R.; COSWIG, I. Type 2 heat-labile enterotoxin (LT-II)-producing *Escherichia coli* isolated from ostriches with diarrhea. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 245-249, 2005.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NGUYEN, S.V.; 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. **Can. J. Vet. Res.**, v. 70, p. 62-64, 2006.

OLIVERIA, D.D.; RESENDE, J.S.; FATSCHART, A.V.F.; ABREU, J.T.; FATSCHART, R.B.; MARTINS, N.R.S. Purificação de IgG de codorna a partir de soro e gema de ovos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 62, n. 2, p. 492-494, 2010.

PAUL, K.; MANJULA, J.; DEEPA, E.P.; SELVANAYAGAM, Z.E.; GANESH, K.A.; RAO, P.V.S. Anti-*Echis carinatus* venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 50, p. 893-900, 2007.

POETA, P.; RODRIGUES, J. Detecção da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de casos clínicos ocorridos em animais de companhia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 2, p. 506-508, 2008.

POLSON, A.; COETZER, T.; KRUGER, J.; VON MALTZHN, E.; VANDER MERWE, K.J. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. **Immunol. Invest.** v. 14, p. 323-327, 1985.

QUIN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, p. 512, 2005.

RAYAMAJHI, N.; CHA, S.B.; SHIN, S.W.; JUNG, B.Y.; LIM, S.; YOO, H.S. Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other Enterobacteriaceae isolates from Korean farm animals. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 2, p. 103-120, 2011.

REMFREY, J. Ethical aspects of animal experimentation. In: TUFFERY, A.A. **Laboratory animals: an introduction for new experimenters**. New York. Interscience, p. 5-9, 1987.

RIBEIRO A.; MUNIZ R. L. **Anuário 2007 de Avicultura Industrial**. Edição 1151, n. 11, ed. Ltda, p.101-103, 2007.

RIBEIRO, A.M.L.; PINHEIRO, C.C.; SILVA, I.M. Uso de gema de ovo de galinhas hiperimunizadas para vacinação de suínos. **Acta Sci. Vet.**, 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 diarréia neonatal de leitões. **R. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 4, p. 1234-1239, 2005.

RON, E.Z. Host appecificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Current Opinion Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2006.

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

SAHINDURAN, S. Isolation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from ostriches with conjunctivitis and respiratory disease. **Revue Med. Vét.**, v. 155, n. 3, p. 167-169, 2004

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; TALIA, M.; MANNA, A.; POMPETTI, F.; FAVARO, M.; FONTANA, C.; FEBBO, F.; BALBINOT, A.; DI BERARDINO, F.; DI BONAVENTURA, G.; DI ZACOMO, S.; ESATTORE, F.; D'ANTONIO, D. Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1551-1552, 2008.

SCHAUSS, K.; FOCKS, A.; HEUER, H.; HOTZERKE, A.; SCHMITT, H.; THIELEBRUHN, S.; SMALLA, K.; WILKE, B.; MATTHIES, M.; AMELUNG, W.; SCHLOTTER, M. Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. **Trends Anal. Chem.**, v. 28, n. 5, 2009.

SHIMIZU, M., NAGASHIMA, H., SANO, K. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 56, n. 2, p. 270-274, 1992.

SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; SALERMO, T.; TAKAHIRA, R.K.; LOPES, M.D.; PRESTES, N.C.; SILVA, A.V. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 60, n. 5, p. 1263-1266, 2008.

SILVA, Z.N.; CUNHA, A.S.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.A.M.; ALMEIDA, A.C.F.; QUEIROZ, M.L.P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. 375-9, 2001.

SILVA, J.A.; SILVA, W.D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Vet. Patol. Trop.**, v. 34, n. 3, p. 175-196, 2005.

SMITH, D.J.; KING, W.F.; GODISKA, R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. **Inf. Immun.**, p. 3135-3142, 2001.

SOUZA, S. D. J. **Criação de Avestruz**. Viçosa, MG: Editora Aprenda Fácil, p. 18-20 ,2006.

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. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 60, n. 5, p. 886-888, 1996.

SUNWOO, H.H.; LEE, E.N.; MENNINEN, K.; SURESCH, M.R.; SIM, J.S. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody IgY on *Escherichia coli* 0157:H7, **J. Food Sci.**, v. 67, n. 4, p. 1486-1494, 2002.

TATFENG, Y.M.; USUANLELE, M.U; ORUKPE, A.; DIGBAN, A.K.; OKODUA, M.OVIASOGIE, F.; TURAY, A.A. Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches. **J. Vect. Borne Dis.**, v. 42, p. 129-134, 2005.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996, 792p.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, n.5, p. 493-499, 2001.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 131, n. 3, p. 569-574, 2002.

TODD, E.C.D.; GREIG, J.D.; BARTLESON, C.A.; MICHAELS, B.S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 2. Description of outbreaks by size, severity, and settings. **J. Food Prot.**, v. 70, n. 8, p. 1975-1993, 2007.

TSEN, Y.C. KAO, G.Y, CHANG, C.L et al. Evaluation and validation of a Duck IgY antibody based immunoassay for high-sensitivity C-reactive protein: Avian antibody application in clinical diagnostics. **Clin. Chem.**, v. 49, n .5, p. 810-813, 2003.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA – UBA. **Anuário 2007/2008**. Disponível em: <http://www.uba.org.br/uba_re108_internet.pdf> Acesso em: 10 março 2011.

UHL, M.V.C; BOTTECCHIA, R.J; AZEVEDO-SILVA, J.; ANTONIO, D.L.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; MITTMANN, J.; DAMASCENO RIBEIRO, P.; DE SOUZA CAMPOS FERNANDES, R.C.; TÁVORA, N.; MEDINA-ACOSTA, E. Suitability of a recombinant *Staphylococcus aureus* enterotoxin C bovine variant for immunodiagnosics and therapeutic vaccine development. **Vaccine**, v. 22, p. 4191-4202, 2004.

VAN DUIJKEREN, E.; HOUWERS, D.J.; SCHOORMANS, A.; BROEKHUIZEN- TINS, M.J.; IKAWATY, R.; FLUIT, A.C.; WAGENAAR, J.A. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. **Vet. Microbiol.** v. 128, n. 1-2. p. 213-215, 2008.

VAN BELKUM, A.; MELLES, D.C.; PEETERS, J.K.; VAN LEEUWEN, W.B.; VANDUIJKEREN, E.; HUIJSDENS, X.W. Methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, p. 479-83, 2008.

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. **Scand. J. Immunol.**, Supplement B, v. 54, Suppl 1 p. 117, 2001.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; FOLLY, M. M.; SAKIYAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis, using PCR and routine techniques. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 27-31, 2001 a.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; SILVEIRA, L.S.; TEIXEIRA, G.N.; CARDINOR, C.B.; LEMOS, L.S.; SILVA, R.S.T.; BRANCO, A.T. Diagnóstico microbiológico e histopatológico de mortalidade em avestruz (*Struthio camelus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 60, n. 4, p. 1014-1016, 2008.

WANG, X.Z., FAN. B., LIU, L.G. et al. In vitro inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**, v. 165, p. 381-387, 2008.

WANG Q.; HOU X.J.; CAI K.; LI T.; LIU Y.N.; TU W.; XIAO L.; BAO S.Z.; SHI J.; GAO X.; LIU H.; TIAN R.M.; WANG H. Passive protection of purified yolk immunoglobulin administered against Shiga toxin 1 in mouse models. **Can. J. Microbiol.**, v. 56, n. 12, p. 1003-1010, 2010.

WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Vet. Microbiol.**, v. 115, p. 148-155, 2006.

WILLIAMS, R.; BOSHOFF, C.H.; VERWOERD, D.; SCHOEMAN, M.; VAN WYK, A.; GERDES, T.H.; ROSS, K. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. **Avian Dis.**, v. 41, n. 4, p. 864-869, 1997.

XIAO-LIANG, L.; JIANG-BING, H.; WEI-HUAN, F. Protection of *Carassius auratus* Gibelio against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v. 7, n. 11, p. 922-928, 2006.

YOKOYAMA, H., PERALTA, R. C., UMEDA, K., HASHI, T., ICATLO F. C. JR, KUROKI, M., IKEMORI, Y., KODAMA, Y. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. **Am. J. Vet. Res.**, v. 59, n. 4, p. 416-20, 1998.

YOKOYAMA, K., SUGANO, N., SHIMADA, T. et al. Effects of egg yolk antibody against *Porphomonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. **J. Oral Sci.**, v. 49, n. 3, p. 201-206, 2007.

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

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

ZHEN, Y.H., JIN, L.J., LI, X.Y. et al. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Vet. Microbiol.**, v. 133, p. 317-322, 2009.

10 ANEXOS



Anexo 1 - Avestruzes utilizadas no experimento (A) e local da inoculação das proteínas recombinantes (B) .



Anexo 2 - Procedimento de colheita de sangue das avestruzes (veia braquial).



Anexo 3 – Retirada da gema do ovo de avestruz para extração da IgY (A e B).



Anexo 4 - Inoculação da IgY purificada nos coelhos (A) e cabra (B) para produção de anti-anticorpos anti-IgY.

Reagentes para ELISA

Tampão Salina Fosfato (PBS) pH 7,2-7,4

NaCl.....	4,0 g
KCl.....	0,045 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,5 g
Água destilada qsp.....	500 ml

Solução tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9,6

Na ₂ CO ₃ 0,1015 M.....	0,8 g
NaHCO ₃ 0,035 M.....	1,47 g
Água destilada qsp.....	500 ml

Tampão de lavagem PBST

Salina pH 7,4.....	500 ml
Tween-20 (Sigma, EUA) 0,05%.....	0,25 ml

Solução de bloqueio

Para preparo de 100 ml e salina pH 7,4

Soroalbumina bovina (Sigma EUA).....	2,0 g
Gelatina (Sigma EUA).....	1 g

Tampão ácido (Solução reveladora – p/ 12,5 ml)

Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O) 0,1 M.....	3,25 ml
Fosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄) 0,2 M.....	3,5 ml
HaO ₂ 30 v.....	0,005 ml
Ortofenildiamina (OPD).....	5 mg
Água destilada qsp.....	5,7 ml

O OPD deve ser adicionado imediatamente antes do uso.

Ácido Sulfúrico

(H ₂ SO ₄) 3 N.....	84,1 ml
Água destilada qsp.....	1000 ml

Reagentes para SDS-PAGE e Western blot

Tampão fosfato 1M pH 7,4 (transferência)

Solução estoque	
200 ml NaHPO ₄	1 M
200 ml Na ₂ HPO ₄	1 M

Preparo

200 ml da solução 1
200 ml da solução 2

Tampão TST (10X)	
Tris ph 7,4 (12,11 g/l).....	100 mM
NaCl (87,1 g/l).....	1,5 M
Tween-20 (5ml/l).....	0,5%

Solução de bloqueio (1X)

Tampão TST-20.....	100 ml
Leite em pó 0,3%.....	3 g

Solução reveladora (p/20 ml)

TrisHCl pH 7,4 40 nM.....	0,8 ml
Imidazol 100 nM.....	2,0 ml
H ₂ O ₂ 30 v.....	0,012 ml
DAB (3,3 Diaminobenzidina).....	20 mg
Água destilada.....	17,2 ml

Soluções para preparo de géis de acrilamida

Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Dissolver 27,23 g de Tris-base em aproximadamente 100 ml de água bidestilada; ajustar o pH a 8,8 com HCl 6 N; completar o volume para 150 ml e guardar a 4° C.

Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Dissolver 6 g de Tris-base em aproximadamente 60 ml de água bidestilada, ajustar o pH a 6,8 com HCl 6 N; completar o volume para 100 ml e guardar a 4°C.

Tampão de amostra (4x concentrado)

TrisHCl pH 6,8.....	1,0 ml
Glicerol.....	10%
Azul de bromofenol.....	0,5%
Água ultrapura.....	5,4 ml

Tampão de corrida (10x)

Tris base.....	30,3 g
----------------	--------

Glicina.....	144,0 g
Azul de bromofenol.....	0,5%
Água destilada.....	1000 ml

Gel de separação 15% (p/2 géis)

Tampão lower.....	4,0 ml
Bis/acrilamida.....	7,5 ml
APS 10%.....	0,03 ml
TEMED.....	0,02 ml
Água destilada qsp.....	3,5 ml

Tampão lower p/ 100 ml

TrisHCl 1,5 M pH8,8.....	181,65 g
SDS 0,4%.....	4,0 g
Água destilada.....	completa

Kits utilizados:

1 - Para purificação da IgY:

- Coluna de Afinidade HiTrap™ IgY- GE Healthcare

2- Para purificação da IgG:

- Coluna de Afinidade HiTrap™ IgG- GE Healthcare

3 - Para biotinylação dos anticorpos anti-avestruz:

- ImmunoProbe Biotinylation Kit – Sigma-Aldrich

4- Para extração de DNA bacteriano:

- Blood Genomic Prep Spin Kit - GE Healthcare.