

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

MARIANE PINTO FERNANDES TÁVORA

**APLICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*)
E PROTEÍNA RECOMBINANTE LACK DE *Leishmania chagasi* NO ENSAIO
IMUNOEZIMÁTICO DESTINADO AO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Campos dos Goytacazes

2014

MARIANE PINTO FERNANDES TÁVORA

**APLICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*)
E PROTEÍNA RECOMBINANTE LACK DE *Leishmania chagasi* NO ENSAIO
IMUNOEZIMÁTICO DESTINADO AO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e
Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro como requisito
parcial para obtenção de grau de Doutora
em Ciência Animal na Área de
Concentração Sanidade Animal

ORIENTADOR: Prof. Olney Vieira da Motta

Campos dos Goytacazes

2014

MARIANE PINTO FERNANDES TÁVORA

**APLICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*)
E PROTEÍNA RECOMBINANTE LACK DE *Leishmania chagasi* NO ENSAIO
IMUNOEZIMÁTICO DESTINADO AO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciência Animal na Área de Concentração Sanidade Animal

Aprovada em 24 de setembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Valmir Laurentino Silva (Doutor em Biologia Animal) – FIOCRUZ-RJ

Prof. Antônio Teva (Doutor em Biologia Celular e Molecular) – FIOCRUZ-RJ

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Doutor em Ciências Veterinárias)-
UENF

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências em Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

Aos meus pais, marido e filhos amados.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho contei com a colaboração de uma equipe muito competente de técnicos, Doutores, além do apoio de amigos, familiares e por isso agradeço a Deus por essa oportunidade.

Assim, agradeço às seguintes pessoas:

Ao meu orientador Olney Vieira da Motta por me receber com tanto carinho e compreensão, tendo certeza de que, sem a sua ajuda, não teria continuado por esse caminho.

Ao Dr. Valmir Laurentino Silva e Dra. Fernanda Nunes Santos do Departamento de Ciências Biológicas da ESNP pela ajuda incondicional e disponibilidade para me incentivar em todos os momentos. E a todo pessoal do laboratório em especial à Rosemere Duarte pelo carinho e atenção.

À Dra. Eliame Mouta Confort do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Ipec/Fiocruz pela atenção e confiança.

Ao Dr. Enrique Medina-Acosta pela confiança e apoio.

Aos meus pais Néرتون Távora e Zilma Távora pelo apoio incondicional e presença em todos os momentos. Mainha e painho são presenças extremamente importantes em minha vida e na dos meus filhos, visto que sempre são apoio em minhas decisões profissionais e no cuidado com meus amados Joaquim e João.

Aos meus amados filhos Joaquim e João que nasceram durante o Doutorado e que, mesmo com tantos afazeres, eu consegui superar todas as dificuldades cuidando deles e ficando longe nas idas ao Rio de Janeiro para realizar este trabalho.

Aos meus colegas Luize Néli Garcia e Fernando Tobias, pela atenção de sempre e pelo suporte durante o curso.

Um agradecimento especial à Zila, do Laboratório de Biotecnologia/CBB/UENF pela ajuda, atenção e carinho.

À minha melhor amiga Maria Fabíola Nunes Rangel pelo carinho, atenção, incentivo e ajuda em todos os momentos de minha vida.

Às minhas colegas e amigas Luciana Matias e Luize Néli Garcia pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao meu irmão Augusto Távora, minha cunhada Mariana e ao meu sobrinho Pedro Távora que me receberam tão bem em Niterói em todas as idas à ENSP/FIOCRUZ para a realização de grande parte deste trabalho. Minha querida cunhada sempre cuidando de tudo para me agradar.

Ao meu marido pela compreensão e ajuda com nossos filhos amados.

Às colegas de laboratório Marcella Braga e Fernanda Ribeiro pelas conversas e apoio.

Aos amigos Patricia Uebe Connor e João Cardoso de Melo pela amizade e apoio.

E por fim agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

“Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

RESUMO

As Leishmanioses são doenças mundialmente negligenciadas, e no Brasil é registrado um aumento acentuado no número de casos de Leishmaniose Visceral desde 1999. As ferramentas atuais de diagnóstico da Leishmaniose Visceral incluem a sorologia, muito importante para o controle da doença. Este estudo descritivo teve como objetivo desenvolver e avaliar o desempenho de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), utilizando a proteína recombinante recLack e IgY anti-recLack produzido em avestruz, *Struthio camelus*. A recLack de *Leishmania chagasi* foi inoculada em avestruz na concentração 2,0 mg/mL, resultando em transferência de anticorpos para a gema do ovo. A extração da IgY da gema foi realizada com Sulfato de Amônio (0,06g/mL e 0,07 g/mL) e Sulfato de Sódio (0,07 g/mL e 0,08 g/mL), sem diferença na qualidade da extração por ambos os métodos. O anticorpo policlonal IgY e o reagente recLack foram testados para o diagnóstico sorológico da LVC utilizando-se os métodos ELISA e Western Blot. Para o estudo foram utilizadas 72 amostras de soro canino infectado (SCI) para LVC e 72 amostras de soro canino não infectado (SCNI). A IgY reconheceu de maneira eficiente o antígeno recLack pelos métodos ELISA e Western Blot. A proteína recombinante recLack de *L. chagasi* e o Extrato Bruto Total de *L. (L.) infantum chagasi* foram utilizados nos ensaios de ELISA ante SCI e SCNI. Entre as 72 amostras de SCI testadas ante a proteína recLack, sete delas (9,72%) apresentaram positividade no teste de ELISA, quando comparadas às dos antígenos de Extrato Bruto e entre as amostras de 72 SCNI, nove (12,5%) apresentaram reação positiva ante a recLack pelo teste de ELISA. Os dados mostram que a recLack foi pouco reativa, não sendo indicada para uso no diagnóstico pelo método ELISA para LVC. Concluindo, o modelo utilizado para o desenvolvimento de IgY foi eficiente no reconhecimento do antígeno recLack, comprovado pelos testes de ELISA e Western Blot, contudo, a recLack não apresentou compatibilidade para o diagnóstico de LVC, comprovado pelos testes de ELISA realizados com amostras padronizadas de SCI para LVC.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*; proteína recombinante; recLack; diagnóstico; ELISA, IgY de avestruz.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease worldwide, and Brazil recorded a sharp increase in the number of cases of Visceral Leishmaniasis since 1999. Nowadays, the most applied tools in Visceral Leishmaniasis diagnosis are the serological diagnostic methods of importance for the disease control. This descriptive study aimed to develop and evaluate the performance of an immunoenzymatic assay for the canine visceral Leishmaniasis diagnosis (CVL), using the recLack recombinant protein and anti-recLack IgY produced in ostrich (*Struthio camelus*). *Leishmania chagasi* recLack antigen (2,0mg/mL) was inoculated in ostriches, and resulted in IgY transfer for egg yolk. The egg yolk IgY extraction was performed using Ammonium Sulfate (0,06g/mL and 0,07g/mL) and by Sodium Sulfate (0,07 g/mL and 0,08 g/mL), and no visible differences of quality between both methods of extraction was observed. The polyclonal IgY antibodies and recLack reagent obtained were tested as a CVL serological diagnosis, using ELISA and Western Blot methods. Samples of 72 positive and 72 negative for CVL canine serum were used employed. The IgY produced was effective in recognizing the recLack antigen by both ELISA and Western Blot methods. *Leishmania chagasi* recombinant protein (*recLack*) and the total crude extract of *L. (L.) infantum chagasi* were used in ELISA against positive CVL-positive) and negative sera (CVL-negative) from dogs. Among 72 CVL-positive samples tested against recLack protein, seven (9,72%) were positive in the ELISA test, when compared to the antigens contained in the crude extract, and among 72 CVL-negative, nine (12,5%) showed positive reaction to the recLack protein by ELISA. The data shows that recLack has low immunogenic potential, therefore, is not indicated for use in CVL diagnosis by the ELISA method. In conclusion, the animal model used for the development of antibodies was efficient in recLack antigen recognition in the concentration used in this study, as demonstrated by ELISA and Western Blot methods, and the recLack reagent showed no compatibility for CVL diagnosis, confirmed by ELISA tests with standard sera from CVL-positive samples.

Key words: *Leishmania chagasi*; recombinant protein; recLack; diagnostic; ELISA, IgY ostrich.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACAB – Associação dos Criadores de Avestruzes do Brasil
- ACF – adjuvante completo de Freund
- AFI – adjuvante incompleto de Freund
- DAB - 3,3 diaminobenzidina
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPP – Imunocromatografia rápida.
- ECVAM – Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos.
- ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
- Fab – Fragmento de ligação com o antígeno
- FB – Fibra Bruta
- Fc – Fragmento Cristalizável
- HA – Hemaglutinina
- HDL – lipoproteínas de alta densidade
- HIV – Imunodeficiência Adquirida
- IDRM – Reação intradérmica de Montenegro.
- IgA – Imunoglobulina A.
- IgG – Imunoglobulina G.
- IgY – Imunoglobulina Y.
- IT-LEISH – Teste Imunocromatográfico Rápido
- LDL - lipoproteínas de baixa densidade
- LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.
- LV – Leishmaniose Visceral.
- LVC - Leishmaniose Visceral Canina.
- PBS – Tampão fosfato salino
- PBST – Tampão fosfato salino Tween
- PBSTG – Tampão fosfato salino Tween Gelatina
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- R14 – soro de coelho anti-recLack.
- R15 – soro de coelho pré-imunização com recLack.
- RACKs – Receptor for Activated C-Kinase
- recLack – Proteína recombinante Lack.
- RIFI ou IFI- Reação de Imunofluorescência Indireta.
- rK26 – antígeno recombinante 26
- rK39 – antígeno recombinante 39
- RNA – Ácido Ribonucleico
- SDS-PAGE- dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
- TMB – 3,3',5,5' tetrametilbenzidina
- WB – Western Blot.
- WD 40 – motivo estrutural curto de cerca de 40 aminoácidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	16
	2.1 Objetivos específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
	3.1 As leishmanioses	17
	3.1.1 Leishmaniose Visceral	20
	3.1.2 Resposta imune-humoral da Leishmaniose Visceral	21
	3.1.3 A Leishmaniose Visceral Canina	23
	3.2 Métodos diagnósticos indiretos	24
	3.2.1 Técnicas sorológicas	24
	3.2.2 Imunofluorescência indireta	25
	3.2.3 ELISA	27
	3.2.4 Imunocromatografia rápida	28
	3.2.5 Western Blot	30
	3.3 O avestruz	30
	3.4 A IgY	32
	3.4.1 A produção de IgY	33
	3.4.2 Resposta de anticorpos	36
	3.4.3 Composição da gema do ovo	38
	3.4.4 Transferência passiva de IgY do soro para a gema do ovo	39
	3.4.5 Purificação de IgY	40
	3.4.6 Vantagem do uso da IgY e sua utilização como imunobiológico	41
	3.4.7 Utilização da IgY	43
	3.5 A proteína recombinante LACK	45
4	JUSTIFICATIVA	47
5	MATERIAL E MÉTODOS	48

5.1 A produção da proteína reclack	48
5.2 Obtenção da IgY	49
5.2.1 Imunização da ave	49
5.2.2 Coleta de sangue e armazenamento do soro da ave	50
5.2.3 Coleta dos ovos	50
5.2.4 Separação da gema e congelamento	50
5.3 Produção de anticorpos anti-avestruz por meio da inoculação de IgY purificada em coelhos e cabra	51
5.3.1 Imunização dos animais (coelhos e cabra) com IgY purificada para produção de anti-IgY	51
5.3.2 Purificação do soro hiperimune (IgG) de coelho e cabra utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia	52
5.3.3 Purificação de IgG de soro utilizando coluna de afinidade HiTrap™ para Proteína G	52
5.4 Procedimentos realizados utilizando a IgY e recLack	53
5.4.1 Purificação de anticorpos IgY de gemas de ovos da avestruz	53
5.4.2 Quantificação de proteínas	54
5.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	54
5.4.4 Amostras de soro de caninos	55
5.4.5 Tamanho da amostra	56
5.4.6 A produção do Extrato Bruto Total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	56
5.5 ELISA	57
5.5.1 Padronização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) utilizando recLack.....	57
5.5.2 ELISA utilizando o IgY de avestruz anti-recLack ante recLack e extrato total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	58
5.5.3 ELISA utilizando os antígenos recLack e Extrato Bruto Total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ante soros infectados e não infectados para LVC.....	59
5.5.4 Titulação por ELISA de IgY extraído das gemas dos ovos e de amostras de soro de avestruz ante recLack utilizando IgG anti-IgY de coelho e biotinilados.....	60
5.6 Western Blot.....	60

5.6.1 Western Blot da proteína recLack ante soros infectados e não infectados para LVC.....	60
5.6.2 Western Blot da proteína recLack ante IgY de avestruz anti-recLack	62
6.RESULTADOS	63
6.1 Purificação de anticorpos IgY de gemas de ovos da avestruz e quantificação das proteínas	63
6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	63
6.3 Padronização do ELISA utilizando recLack	64
6.4 ELISA utilizando o IgY de avestruz anti-recLack ante recLack e Extrato Total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	64
6.5 ELISA utilizando os antígenos recLack e Extrato Bruto Total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ante soros infectados e não infectados para LVC.....	65
6.6 Titulação por ELISA de IgY extraída das gemas dos ovos e de amostras de soros de avestruz ante recLack utilizando IgG anti-IgY de coelho e cabra biotinilados.....	65
6.7 Western Blot	67
7. DISCUSSÃO	70
8. CONCLUSÃO	73
9. BIBLIOGRAFIA	74

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem focado na busca pelo diagnóstico mais acurado da LVC. Alguns autores visaram ao desenvolvimento de novas técnicas de coleta menos traumáticas para os cães envolvidos (MAIA e CAMPINO, 2008) ou novos métodos diagnósticos (FARIA & ANDRADE, 2012). Entretanto, a maioria dos estudos se concentra na busca por novos antígenos de *Leishmania* (FARIA e ANDRADE, 2012).

Com a intenção de se evitar o uso de métodos invasivos e considerando que a resposta humoral na LVC é geralmente muito intensa, com altos níveis de imunoglobulinas, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos (ALVAR *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2008) que são mais eficazes.

A pesquisa de métodos mais eficientes e de fácil execução é primordial para a identificação do reservatório canino, que orientado pelo Ministério da Saúde, deve ser submetido à eutanásia quando o diagnóstico é positivo.

Existe atualmente uma grande variedade de métodos para diagnóstico canino que empregam diversos antígenos. Porém, ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja empregado em um método de fácil execução. Por essa razão, o diagnóstico sorológico correto da LVC ainda é um desafio, apesar dos progressos (MAIA e CAMPINO, 2008) observados no desenvolvimento de vários métodos.

Portanto, o uso de antígenos específicos são opções importantes tornando o diagnóstico mais seguro e confiável, evitando-se diagnósticos falso positivos, devido às reações cruzadas.

No campo do imunodiagnóstico, para o diagnóstico sorológico para a LVC, o uso de IgY é uma interessante ferramenta devido à diferença filogenética entre aves e mamíferos, não contribuindo para reações cruzadas, além de reduzir o sofrimento e morte de animais experimentais, por se tratar de técnica não invasiva.

A proteína recombinante recLack de *Leishmania chagasi* utilizada neste trabalho foi inoculada em avestruz, *Struthio camelus*, resultando em produção de IgY anti-recLack na gema do ovo. Após a purificação, esses anticorpos foram utilizados como ferramenta em análise descritiva no diagnóstico sorológico da LVC

utilizando soros de cães infectados e não infectados para a doença pelos métodos ELISA e Western Blot com o objetivo de avaliar seu desempenho.

2 OBJETIVO

Desenvolver e avaliar o desempenho de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da LVC, utilizando a proteína recombinante recLack e IgY anti-recLack produzido em avestruz, *Struthio camelus*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Isolar IgY anti-recLack da gema de ovos.
- ❖ Verificar a especificidade de IgY ante o antígeno imunizante recLack.
- ❖ Testar recLack ante o Extrato Bruto Total de *L. (L.) infantum chagasi* pelo teste de ELISA.
- ❖ Avaliar pelo teste de ELISA, a especificidade de recLack ante amostras de soros de cães infectados e não infectados para LVC.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses são entidades nosológicas mundialmente negligenciadas que afetam as populações na sua maioria pobres ou vulneráveis (WHO, 2010). As Leishmanioses compreendem um espectro de doenças distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, cuja gravidade varia desde lesões cutâneas que tendem para autocura até graves lesões mucocutâneas mutilantes ou infecções viscerais. Com uma prevalência de 12 milhões de pessoas e uma incidência anual de 1 a 1,5 milhões de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e 500.000 casos de LV, as Leishmanioses afetam 88 países colocando 350 milhões de pessoas sob risco de adquirir a doença. Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, enquanto que 90% dos casos de LTA ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2000).

As Leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (MARZOCHI, 1992).

O gênero *Leishmania* possui formas características de parasitismo no vertebrado e no inseto do vetor. No mamífero, o parasito apresenta-se sob forma aflagelada, denominada amastigota, que se multiplica no interior das células do sistema mononuclear fagocitário por divisão binária. Após serem ingeridas pelas fêmeas de flebotomíneo, por ocasião do repasto sanguíneo, estas formas transformam-se em formas flageladas, denominadas promastigotas, no tubo digestivo do inseto e, após 4 dias, já podem ser transmitidas a um novo hospedeiro (SHERLOCK, 1996; BOGDAN *et al.*, 1998).

A transmissão da LVC ocorre através da picada da fêmea do vetor das espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi*, nas Américas e do gênero *Phlebotomus* das espécies *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. neglectus* no Velho Mundo (ALMEIDA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2008). Diversos podem ser os hospedeiros vertebrados da LV. Na Índia e no Sudão, a doença, que é causada por *L. (L.) donovani* é uma zoonose, transmitida de humano para humano através da

picada do vetor infectado (ROTUREAU, 2006). Nas Américas e no mediterrâneo, a doença que é causada por *L. (L.) infantum chagasi* (WHO, 2010) é uma zoonose de canídeos (Leishmaniose Visceral Zoonótica). Nos ambientes silvestres, canídeos como raposas (*Dusicy onvetulus* e *Cerdocy onthous*) e o marsupial (*Didelphis albiventris*) são considerados as principais fontes de infecção (MS-SINAN, 2006). Nos ambientes domésticos o cão apresenta-se como a principal fonte de infecção (GRAMICCIA, 2005).

Nas várias formas das Leishmanioses, as características clínicas e epidemiológicas na maioria das vezes não são específicas, confundindo-se com outras doenças. Por isso, o diagnóstico laboratorial é necessário para confirmar a suspeita clínica. Diversas ferramentas têm sido propostas como métodos laboratoriais que auxiliam no diagnóstico das Leishmanioses, no entanto o método “ouro” ainda é a demonstração e o isolamento do parasito. No caso da LV a demonstração do parasito e o isolamento são geralmente feitos em aspirados do baço ou da medula óssea, tendo sido demonstrada uma maior sensibilidade quando o aspirado de baço é utilizado, embora esta abordagem ofereça uma série de riscos. Ocasionalmente, as amastigotas têm sido visualizadas em biópsias de fígado, aspirados de linfonodos e esfregaços do creme leucocitário, particularmente em casos de co-infecção Leishmania-HIV. No entanto, o uso destes métodos na investigação epidemiológica tem sido discutido, considerando que são muito invasivos e pouco sensíveis para detectar o parasito no caso de infecção oculta ou subclínica. Por isso, métodos indiretos de detecção do parasito têm sido desenvolvidos e aplicados como ferramentas auxiliares no diagnóstico da LV (CUPOLILLO, *apud* OPS 2005).

O Brasil registra um aumento acentuado no número de casos de LV desde 1999. Assim, as ondas de seca, a falta de terras disponíveis, e a fome levaram a uma grande migração da população das áreas rurais para os subúrbios periféricos das grandes cidades, com a criação de assentamentos densamente povoadas e com infra-estrutura mínima de saneamento. Cães habitualmente mantidos no ambiente doméstico é o reservatório animal principal para a infecção. A LV está progredindo rapidamente no norte da Argentina e nas áreas de fronteira com Brasil e Paraguai (WHO, 2012).

No Brasil, as estratégias de controle da LV estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de

inseticidas e na detecção dos cães infectados por análises parasitológicas e sorológicas (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e Ensaio imunoenzimático – ELISA) com posterior eutanásia dos animais positivos (BRASIL, 2003). Enquanto os testes sorológicos apresentam mais resultados falso positivos por causa das reações cruzadas com outros patógenos (BADARÓ *et al.*, 1983; INIESTA *et al.*, 2002), os métodos parasitológicos são mais precisos, mas também mais invasivos porque, usualmente, requerem punção de linfonodo periférico ou da medula óssea.

O controle da Leishmaniose depende da disponibilidade de métodos acurados e sensíveis para detecção das espécies de *Leishmania* (RODRIGUES, 2000). O uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, de fácil execução e interpretação, que não necessitem de infra-estrutura laboratorial e profissionais especializados, deverá trazer benefício importante para o diagnóstico acurado e rápido da LV, principalmente nas localidades onde o acesso a exames laboratoriais mais complexos é limitado (ASSIS *et al.*, 2008).

O diagnóstico de uma enfermidade como a LV requer o uso de métodos que possam, de maneira segura e confiável, identificar os indivíduos infectados. As técnicas empregadas para este fim devem ser providas de algumas propriedades, tais como: capacidade de detecção da infecção em sua fase inicial, resultados precisos, fácil execução, baixo custo e repetibilidade. A escolha do método ou teste de diagnóstico deve ser orientada após cuidadosa avaliação da situação na qual será empregado. Variáveis como características epidemiológicas da doença, dados de prevalência e incidência, hospedeiros envolvidos, modo de transmissão e período de incubação, dentre outras, precisam ser conhecidas (LEAL, 2009).

O diagnóstico da LVC pode ser realizado por diversos métodos, e a confiabilidade desse diagnóstico será proporcionada pela combinação de técnicas, uma vez que não há uma única técnica que possa de modo inequívoco indicar a infecção (LEAL, 2009).

Nesta revisão, serão empregados métodos diagnósticos das LVC de interesse do presente trabalho.

3.1.1 Leishmaniose Visceral

A LV é uma zoonose causada por parasitos pertencentes ao Gênero *Leishmania*, sendo que nas Américas, a *L. chagasi* é a espécie incriminada como agente causadora da doença. É transmitida pela da picada de fêmeas do inseto vetor infectado, pertencente ao Gênero *Lutzomyia*. No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi*, e mais recentemente, a *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 1987; REBÊLO *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1998 *apud* OPS/OMS, 2005).

Os reservatórios silvestres identificados e potencialmente envolvidos na transmissão são as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Os cães (*Canis familiaris*) são considerados reservatórios domésticos da *L. (L.) chagasi* e caracterizados como principal fonte de infecção para o vetor (DEANE & DEANE, 1954; DEANE, 1956; MARZOCHI, 1985; BRASIL, 2003 *apud* OPS/OMS, 2005).

A doença canina é considerada, do ponto de vista epidemiológico mais importante que a doença humana, já que, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitos na derme, com potencial para transmitir a doença (MARZOCHI *et al.*, 1985). Os caninos domésticos são responsabilizados pela dispersão da doença a partir de focos enzoóticos. A doença no cão geralmente precede a ocorrência da doença no homem, sendo que ambas coexistem em todos os focos conhecidos (BADARÓ *et al.*, 1996).

A apresentação clínica habitual no homem caracteriza-se por febre prolongada, perda de peso, hepato-esplenomegalia e pancitopenia. Uma das preocupações atuais com a LV é sua elevada letalidade: próxima a 100% em pacientes não tratados. Mesmo com a instituição do tratamento, 1 a 5% dos afetados morrem como resultado da resistência à quimioterapia, pela toxicidade dos quimioterápicos, ou como consequência de complicações da doença, principalmente quando o diagnóstico é tardio (BERMAN, 1997).

As lesões de pele, como a alopecia e as dermatites, são comuns na LVC (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2004; ORDEIX *et al.*, 2005). No entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico (CABRAL *et al.*, 1998) e mesmo na pele

cl clinicamente sadia pode haver a presença de parasitos, o que alerta para a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2004).

No Brasil, LV é endêmica com transmissão autóctone em todos os estados da federação. No meio urbano, o cão doméstico atua como um reservatório de *Leishmania chagasi* (*L. infantum* syn.) e como agente etiológico da LV nas Américas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As estratégias de controle da doença utilizadas no Brasil estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de inseticidas e na detecção dos cães infectados por análises parasitológicas e sorológicas (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e ensaio imunoenzimático – ELISA) com posterior eutanásia dos animais positivos (BRASIL, 2003).

Em relação ao diagnóstico, uma desvantagem dos testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com outros agentes e, assim, em áreas onde outras espécies de *Leishmania* dermatrópicas ou outros tripanossomatídeos também estão presentes, o diagnóstico sorológico deve ser usado com cautela uma vez que estes agentes podem compartilhar determinantes antigênicos e mostrar resultados confusos (VEXENAT *et al.*, 1996; MADEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011).

Embora o avanço tecnológico ocorrido no século XX tenha resultado em uma variedade de técnicas laboratoriais importante na contribuição ao diagnóstico de doenças em geral e das infecciosas em particular, o diagnóstico da LV avançou pouco nas últimas décadas, provavelmente por duas razões principais: por se tratar de doença negligenciada, que prevê pequeno retorno comercial ao investimento em pesquisa e desenvolvimento e pela complexidade biológica própria da infecção (ASSIS *et al.*, 2008).

3.1.2 Resposta imune-humoral da Leishmaniose Visceral

Na LVC é relatada a presença de uma forte resposta imune-humoral. Cães infectados apresentam níveis séricos aumentados de anticorpos, principalmente da

classe IgG, embora o aumento de imunoglobulinas, não esteja correlacionado à proteção (PINELLI *et al.*, 1994) e sim à sintomatologia (COURTENAY *et al.*, 2002).

Em humanos, apesar da ocorrência de uma depressão da resposta imune celular, pacientes com LV apresentam títulos elevados de anticorpos anti-*Leishmania* (BADARÓ *et al.*, 1983; DUXBURY *et al.*, 1964; SHAW *et al.*, 1964) os quais têm inclusive sido utilizados como critério de diagnóstico da doença (HO, *et al.*, 1983; REZAI *et al.*, 1978). Badaró *et al.* (1985) demonstraram que indivíduos que adquirem LV não são geneticamente incapacitados de responder a antígenos de *Leishmania* e que a persistência de títulos elevados de anticorpos anos após o tratamento, sugere que o parasita permaneça no hospedeiro após a cura clínica da doença.

A resposta para IgA, foi encontrada em altos níveis em cães que sofrem da doença de forma aguda, estando sua produção relacionada ao intenso parasitismo nos diferentes tecidos, visto que é produzida quando o parasito se espalha por diferentes partes do corpo, inclusive pela mucosa. A resposta de IgM, ocorre de forma mais tardia, após aparecimento da resposta IgG, demonstrando não ser bom marcador de fase aguda (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2007). A gravidade da infecção por *Leishmania* evidenciada pela presença de DNA no sangue, está correlacionada com o aumento de sinais clínicos e com os aumentados títulos de IgA e IgM (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2007), IgG, IgG1, IgG2 (RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2007; COURTENAY *et al.*, 2002). Mais recentemente foi demonstrada a presença de resposta de IgE em cães sintomáticos demonstrando a possível utilização como marcador ativo da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005 a; INIESTA *et al.*, 2005).

As consequências, evolução e severidade da LV em mamíferos dependem da resposta imune celular do hospedeiro, especialmente do perfil de produção de citocinas (BARRAL-NETTO, 1992). Esse perfil de produção de citocinas varia conforme a constituição genética do indivíduo, os fatores inerentes ao parasito como espécie, cepa e tamanho do inóculo e, possivelmente, a presença de produtos da saliva do vetor no local de inoculação dos parasitos (GRIMALDO; TESH, 1993).

A resistência à infecção por *Leishmania* está ligada à ativação de células TCD4⁺ do tipo Th1, com uma produção significativa de Interferon γ e IL-2. Esse tipo de resposta é induzida basicamente por Interferon γ , citocina esta que ativa resposta

imune do tipo Th1 e inibe a resposta do tipo Th2 (GAZZINELLI, 1993; HEUFLER, 1996; TRICHERI, 1993).

Em trabalho recente Laranjeira (2009) que demonstrou que os animais de área endêmica apresentaram altos níveis de IgG e IgG2 independentemente de estarem parasitados, demonstrando que a exposição frequente ao parasito leva ao desenvolvimento da resposta imune-humoral independentemente do estado patológico. Em relação à IgG total, os resultados foram capazes de distinguir animais parasitados dos não parasitados, o que não ocorreu com IgG2.

3.1.3 A Leishmaniose Visceral Canina

A LVC causa grande variedade de sinais clínicos incluindo febre intermitente, letargia, alterações do apetite, emaciação, anemia, esplenomegalia, linfadenopatia, lesões cutâneas como seborreia seca, prurido, ulcerações, onicogribose, entre outras (LONGSTAFFE *et al.*, 1983; BURACCO *et al.*, 1997; CIARAMELLA *et al.*, 1997; FEITOSA *et al.*, 2000). Outros sintomas são observados como problemas locomotores, alterações renais, diarreia, alopecia periorcular, epistaxe (LONGSTAFFE *et al.*, 1996), uveíte (GARCIA-ALONSO *et al.*, 1996), osteossinovite, artrossinovite (BURACCO *et al.*, 1997) e paresia dos membros posteriores.

A suspeita clínica é relativamente simples em cães sintomáticos, o que não representa a totalidade dos cães soropositivos (BRANDONISIO *et al.*, 1992; DANTAS-TORRES *et al.*, 2006) . Em torno de 60% a 80% dos cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença, que pode permanecer inaparente por longos períodos (QUEIROZ *et al.*, 2010). Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados assintomáticos podem transmitir o parasito para flebotomíneos, tendo um papel ativo na transmissão da doença (ALVAR *et al.*, 1994; MOLINA *et al.*, 1994; ABRANCHES *et al.*, 1998). Além disso, a maioria dos sinais observados é comum a outras doenças caninas, como por exemplo, erliquiose e babesiose (GOMES *et al.*, 2008), e a imunossupressão causada pela infecção pode gerar infecções oportunistas, dificultando ainda mais o diagnóstico clínico (SILVA, 2007). Desta maneira, a associação entre os parâmetros

clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos faz-se necessária para o diagnóstico definitivo (FREITAS *et al.*, 2012).

3.2 Métodos diagnósticos indiretos

No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Leishmanioses, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, recomenda que o diagnóstico da LV seja realizado por métodos parasitológicos, preferencialmente o exame microscópico de aspirado de medula e, alternativamente, usando-se técnicas baseadas na detecção de anticorpos: RIFI ou ELISA. Atualmente, o kit de RIFI é produzido por Biomanguinhos, unidade da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro-RJ, e distribuído pelo Ministério da Saúde para laboratórios públicos locais e nacionais. Esse método, entretanto, requer microscópio de imunofluorescência e profissional treinado para sua execução, tornando o diagnóstico lento e difícil (ASSIS *et al.*, 2008).

3.2.1 Técnicas Sorológicas

No Brasil, a eliminação de cães infectados é recomendada pelo Ministério da Saúde como medida de controle da LV. Por isso um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade é necessário para a triagem desses reservatórios. Com a intenção de se evitar o uso de métodos invasivos e considerando que a resposta humoral na LVC é geralmente muito intensa, com altos níveis de imunoglobulinas, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos (ALVAR, 2004; GOMES, 2008). Assim, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos e são bastante utilizados para o diagnóstico canino.

A pesquisa de anticorpos específicos tem muito valor no diagnóstico da LV, quando há indução de resposta humoral e pouca utilidade no diagnóstico da LT, quando há insuficiência de resposta humoral e maior indução da resposta celular (MS, 2011).

De acordo com Duxbury & Sadun (1964) o diagnóstico sorológico é favorecido pela expressiva resposta imune-humoral que caracteriza a doença. A pesquisa de anticorpos, entretanto, deixa a desejar no que concerne à especificidade. Além disso, essas técnicas demandam tempo, equipamentos e laboratoristas treinados.

A combinação das técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de maior número de animais positivos para LVC em diferentes áreas endêmicas (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Para o diagnóstico da LVC, as técnicas sorológicas são consideradas rápidas e práticas, mas com sensibilidade variável e especificidade baixa (BADARÓ *et al.*, 1983; INIESTA *et al.*, 2002).

3.2.2 Imunofluorescência Indireta

Empregado a partir da década de 1960 (DUXBURY & SADUN, 1964), o teste de Imunofluorescência Indireta, que utiliza o parasito íntegro como antígeno, é bastante útil em estudos epidemiológicos (ALVAR *et al.*, 2004). Entretanto, sua aplicação requer alto nível de habilidade, experiência e também equipamento especializado e de alto custo. Além disso, as diluições seriadas do soro tornam o teste laborioso e inviável para uma triagem com grande número de amostras. Sua sensibilidade varia de 83 a 100% e sua especificidade é de aproximadamente 80% para amostras de soro (HARITH, *et al.*, 1987; ALMEIDA *et al.*, 2005; LIRA, 2005). Todavia, esse método pode apresentar reações cruzadas principalmente com LTA e tripanossomíase americana (GONTIJO & MELO, 2004). No Brasil, os títulos obtidos na RIFI, iguais ou superiores a 1:40, são considerados positivos (MS, 2006).

A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), desde sua proposição por Oddo & Cascio (1963), tem-se mostrado útil no diagnóstico da LTA (CUBA CUBA *et al.*, 1980) devido à sua elevada sensibilidade (MARZOCHI *et al.*, 1980), embora apresentando reações cruzadas com outros tripanossomatídeos agentes de outras Leishmanioses e Tripanossomíases (GUIMARÃES *et al.*, 1969; CAMARGO & REBONATO, 1969; FURTADO, 1980; SALFELDER & MANNWEILER, 1981).

A RIFI tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV desde 1964 (DUXBURY & SADUN, 1964) com a desvantagem de requerer microscópio de

imunofluorescência. Sensibilidade de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92% são relatadas, dependendo da preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizadas (CAHIL, 1970; SENGUPTA, 1969).

De acordo com Silveira *et al.* (1999) que trabalhou com 1418 pacientes suspeitos de LTA realizando os seguintes testes diagnósticos de Intradermorreação de Montenegro, IFI, pesquisa direta e isolamento e identificação de *Leishmania*, verificou-se que, entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial positivo para LTA, a IDRm apresentou positividade de 95,1%, seguindo-se a IFI de 64,4% e o parasitológico de 59,4%. Também foi observado que a associação entre IFI e IDRm, alcançou uma positividade de 98,8% e a do parasitológico e IDRm uma positividade de 97,2%. Estes resultados permitem sugerir que, na impossibilidade da utilização das três técnicas, a IDRm seja sempre associada com a IFI ou com o parasitológico para diagnósticos mais seguros.

A RIFI apresenta resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Habitualmente negativa na forma cutânea difusa, sua sensibilidade foi estimada em 71% nas formas cutâneas e 100% na forma mucosa (MENDONÇA *et al.*, 1988). Em pacientes com lesões recentes (1 a 6 meses de evolução), é frequente a negatividade sorológica. Nos casos positivos, os títulos médios são significativamente mais elevados naqueles que apresentam múltiplas lesões, refletindo a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitos. Além disso, o número de reações sorológicas negativas é maior entre os que possuem o exame parasitológico positivo quando comparado aos daqueles em que a pesquisa direta do parasito revela-se negativa (CHIARI, 1973). Após o tratamento e cura, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses (CARVALHO, 2000; MONTENEGRO, 1926).

A técnica RIFI possui sensibilidade da reação em LV variando de 80% a 95%, porém em pacientes coinfetados varia de 50% a 60%. Para o exame, bastam 10µL de soro ou plasma. O material deve ser enviado ao laboratório tão logo seja coletado. Quando o envio ao laboratório não puder ser imediato, o sangue deve ser centrifugado e o soro ou plasma podem ser armazenados a 4°C, por até 48 horas até o processamento no laboratório. Caso seja necessário o armazenamento por período superior a 48 horas, a amostra deverá ser armazenada a -20° C (MS, 2011).

3.2.3 ELISA

O método imunoenzimático “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), emprega grande variedade de antígenos e tem sido avaliado desde 1971 (HO *et al.*, 1983). Embora os valores de sensibilidade apresentem reprodutibilidade, variando entre 90 e 100%, os valores de especificidade são bastante inconsistentes, variando de 71 a 100% (BRAY, 1985; PEDRAS *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por Alves *et al.* (2012) que investigaram cães infectados com *T. caninum* avaliando a reação cruzada com LVC, foi utilizado o teste ELISA como teste de triagem e a RIFI como teste confirmatório, em que 23% (n=9) do total de 39 animais infectados com *T. caninum* teriam sido erroneamente diagnosticados como LVC.

A baixa especificidade é a desvantagem comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados, causada pela reatividade cruzada e persistência de anticorpos após a cura. Para tentar contornar esse problema, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados. Entre eles, a proteína recombinante K39 (rK39), uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase de *Leishmania chagasi*, o complexo donovani-específico, (BURNS *et al.*, 1993) os quais têm sido os mais amplamente avaliados, cujo resultado em sensibilidades de 93 a 99% e especificidades de 93 a 100% (PEDRAS *et al.*, 2008; ZIJLSTRA *et al.*, 1998; BRAZ *et al.*, 2002).

Badaró *et al.* (1996) demonstraram a utilidade do antígeno rK39 no diagnóstico sorológico da LVC por meio de ELISA, detectando cães com doença ativa. Scalone *et al.* (2002), trabalhando com cães provenientes de uma área endêmica no sul da Itália, obtiveram 97,1% de sensibilidade e 98,8% de especificidade.

O uso de antígenos recombinantes, de um modo geral, aumenta a especificidade de testes diagnósticos se comparados ao uso de antígenos brutos (MAIA & CAMPINO, 2008). Antígenos brutos fornecem especificidade de 87%, enquanto os antígenos recombinantes rK26 e A2 fornecem especificidades de 90 e 96%, respectivamente, em testes de ELISA realizados em cães (PORROZZI *et al.*, 2007). Entretanto, dados publicados por Rosário *et al.* (2005) apresentam resultados bastante similares para o ELISA com o uso de antígeno bruto (especificidade de

100%), os recombinantes rK26 (especificidade de 96%) e rK39 (especificidade de 100%). A limitação do uso de antígenos brutos consiste na ocorrência de reações cruzadas com outras doenças que frequentemente ocorrem em áreas endêmicas para LVC, o que levou à sugestão de que a associação do uso de antígenos brutos e recombinantes no método de ELISA torna-se uma estratégia interessante a ser utilizada em programas de controle da doença.

O desempenho do teste ELISA no diagnóstico da LVC está relacionado não só com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico do cão em teste. Carvalho *et al.* (2002) relataram bons resultados utilizando o antígeno recombinante A2 com soros de cães sintomáticos e também registraram que a ocorrência de reação cruzada com outras doenças (Rickettsiose, Ehrlichiose e Tripanossomíase Americana) foi insignificante. Mettler *et al.* (2005) demonstraram que o antígeno rK39 apresentou 58% de sensibilidade em cães assintomáticos e 96,7% em sintomáticos, enquanto que com o antígeno solúvel de promastigotas, não houve diferença entre sintomáticos e assintomáticos (sensibilidades de 100% em ambos os grupos), assim como no teste em que foi utilizado o antígeno solúvel de amastigotas.

3.2.4 Imunocromatografia Rápida

“Dual-Path Platform” (DPP) é um teste rápido imunocromatográfico que oferece uma alternativa para o diagnóstico da LVC. Ele está sendo produzido pela Fiocruz (Bio-Manguinhos - Rio de Janeiro, Brasil) e usa rK26 e agente recombinante rK39 específico para *L. chagasi* (Grimaldi *et al.*, 2012.), tendo sido validado para ser utilizado no programa brasileiro de controle da LV. Este dispensa estrutura laboratorial e equipamentos, facilitando o uso no campo. Possui uma tecnologia de alta sensibilidade, o que agrega precisão ao diagnóstico da LVC em sangue, soro ou plasma. Por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, desonerando, desta forma, o laboratório (FIOCRUZ, 2014).

Os estudos de validação de testes para diagnóstico rápido da LV, em formato de fitas imunocromatográficas com antígenos recombinantes, tais como o rK39, em

população sem infecção pelo HIV, demonstraram sensibilidade e especificidade acima de 93% (MS, 2011).

Cada vez mais se buscam técnicas de diagnósticos que apresentem resultado rápido, sensível e específico e que possam ser realizados em campo, com baixas condições de infraestrutura (ANDRADE, 2014). Neste contexto, o teste TR-DPP[®] foi desenvolvido por Bio-Manguinhos em parceria com ChemBio (USA) (FRAGA *et al.*, 2012). O TR-DPP[®] possui vantagens como: fácil armazenamento rapidez, praticidade e flexibilidade nos tipos de amostras biológicas utilizadas (sangue, soro ou plasma) (GRIMALDI *et al.*, 2012). Nesse teste, o antígeno recombinante rK28 (fusão de rK9, rK26 e rK39) (FRAGA *et al.*, 2014) impregnado em uma membrana de nitrocelulose reage com imunoglobulinas específicas presentes nas amostras de animais positivos, sendo a reação revelada pela interação da proteína A, acoplada a partículas de ouro coloidal, com a porção Fc das imunoglobulinas (LEMOS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010).

A proteína recombinante K39 (rK39) foi utilizada em plataformas imunocromatográficas, que permitem execução simples e interpretação visual das reações, apresentando valores de sensibilidade e especificidade que variam de 67 a 100% e de 59 a 100%, respectivamente (RITMEIJER *et al.* 2006; SUNDAR *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2003). Estudos de validação desses testes têm mostrado resultados variáveis, de acordo com a região geográfica do estudo, do produto e da metodologia empregada (RITMEIJER *et al.* 2006).

O teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] (DiaMed IT-LEISH[®]) foi validado para o diagnóstico da LV em quatro áreas endêmicas do Brasil. O desempenho do teste foi comparado ao da reação de imunofluorescência indireta; e ao da reação imunoenzimática, usando-se antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* e recombinante K39 (rK39). No estudo, foram incluídos 332 pacientes com quadro clínico sugestivo de LV: 213 casos de LV confirmados parasitologicamente; e 119 não-casos, com confirmação de outra etiologia. O teste apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 97%. As técnicas RIFI (imunofluorescência indireta), ELISA *L. chagasi* e ELISA rK39 apresentaram sensibilidade de 88%, 92% e 97% e especificidades de 81%, 77% e 84%, respectivamente. Os resultados confirmam a validade do teste para o diagnóstico da LV no Brasil (ASSIS *et al.*, 2008).

3.2.5 Western Blot

O método de Western Blot (WB) é descrita como a mais sensível e específica para detecção da infecção canina, tendo desempenho superior ao da RIFI ou ELISA. Em 2006, um estudo com infecção experimental em cães revelou que o WB foi capaz de discriminar animais na fase de infecção recente ou tardia. Bandas imunodominantes foram detectadas indicando, inclusive, o prognóstico negativo para animais cujo parasitismo persistiu após o tratamento. Isso sugere que essa técnica pode ser usada como preditora da infecção e do parasitismo no cão (TALMI-FRANK *et al.*, 2006).

Como método sorológico de contraprova podemos utilizar o Western Blot por apresentarem alta sensibilidade e especificidade (BRITO *et al.*, 2000), além de detectar baixos níveis de anticorpos identificando animais que são portadores assintomáticos para a doença (DE PAULA *et al.*, 2003; ZANINI *et al.*, 2010).

3.3 O Avestruz

O avestruz pertence ao grupo das ratitas, palavra adaptada do latim científico, *ratitae* e significa aves desprovidas de carena (ausência da musculatura peitoral), possuindo a forma chata como uma jangada. Esta forma dá maior estabilidade a estas aves, provendo um melhor equilíbrio em uma corrida que pode alcançar uma velocidade de 60 Km/h. Estas aves perderam a capacidade de voo, devido à ausência de quilha no osso esterno, e carena (SOUZA, 2006).

O Ministério do Meio Ambiente classificou no Brasil, segundo a Portaria nº 36 de 15 de março de 2002, o avestruz africano, *Struthio camellus*, de animal selvagem e exótico, para doméstico (BRASIL, 2002).

A criação de avestruz (estrutiocultura) teve seu início no século 19, na África do Sul (DRENOWATZ *et al.*, 1995, JEFFERY, 1999). Inicialmente, a exploração concentrou-se na procriação e na produção de penas, com pouco interesse no couro e na carne (DRENOWATZ *et al.*, 1995; TUCKWELL, 1999). Posteriormente a exploração mudou para a produção do avestruz tipo carne (PAYNE, 1998; ADAMS &

REVELL, 1999, TUCKWELL, 1999). Portanto, a produção principal da atual indústria do avestruz é para a carne e couro. Outros produtos incluem o óleo, plumas, ovos e casca de ovos (MORRIS, 1995; SALES, 1995; TUCKWELL, 1999).

A classificação taxonômica do avestruz é a superordem Paleognathae, que são aves da subclasse Neornithes. A ordem é Struthioniformes (DRENOWATZ, 1995 citada por GIANNONI, 2002), com uma única espécie *Struthio camelus* e seis subespécies, comercialmente divididas em três grupos com referência à coloração da pele, conhecidos como: *red neck* (pescoço vermelho), *blue neck* (pescoço azul) e *black neck* (pescoço preto).

Segundo Huchzermeyer (2000), citado por Battisti (2009), o avestruz é a maior ave viva e, na natureza, atualmente, restringe-se ao leste e sul da África. É a única ratita cuja distribuição natural estende-se ao norte da linha do equador. Ao mesmo tempo em que é um animal habitante de planícies e prados abertos áridos e semi-áridos, ele se adapta bem a uma grande variedade de climas em sua ampla distribuição geográfica, desde os invernos chuvosos e algumas vezes com neve na Cidade do Cabo, África, até a condições extremamente quentes dos verões no deserto. A umidade ocasionalmente alta nas áreas chuvosas de verão também é bem tolerada.

Esta ave pode atingir até 2,5m de altura e 150 kg de peso adulto, dependendo de sua raça e localização geográfica, vivendo em média 50 anos. A variedade doméstica atinge a maturidade sexual entre 2 e 3 anos, sendo as fêmeas mais precoces. O dimorfismo sexual ocorre entre 6 e 10 meses de idade, sendo o macho com plumagem preta no corpo e branca na cauda e na ponta das asas, enquanto a fêmea se apresenta com a plumagem homogênea e acinzentada (SOUZA, 2004).

Ao contrário das galinhas poedeiras que necessitam de 25 horas para formar seu ovo, os ovos de avestruz levam aproximadamente 48 horas para se formar, e são postos a cada 2 dias em média (DEEMING, 1995; JEFFEREY, 1999). O ovo de avestruz apresenta em torno de 80-85% de conteúdo, com 15-20% de casca (DEEMING, 1995). O peso do ovo representa de 1-2% do peso corporal de uma fêmea (1,2 a 2 kg/ovo). A cor do ovo varia de um branco opaco ao amarelado palha.

Segundo Angel (1996) os avestruzes são herbívoros e possuem um sistema digestório capacitado para digerir material vegetal de baixa qualidade rico em fibra. Milton *et al.* (1994) verificaram que os avestruzes na natureza selecionam uma dieta com mais de 24 % de fibra bruta (FB).

Segundo a Associação dos Criadores de Avestruzes do Brasil (ACAB), o país contou no ano de 2005, com um plantel de 335.425 mil animais distribuídos por todo o território nacional, e já é o segundo maior criador mundial ficando atrás apenas da África do Sul (BARBOSA *et al.*, 2007).

3.4 A IgY

Em 1893, Klemperer foi o primeiro a descrever um experimento em que foi demonstrado que a imunização de uma galinha causou a transferência de anticorpos específicos para a gema de ovo (apud SCHADE, 2005).

A tecnologia IgY (uso de anticorpos de gema de ovo) encontra-se em ampla expansão devido, principalmente, aos baixos custos de produção das IgY em relação aos dos anticorpos mamíferos. Esta vantagem econômica permite sua aplicação não só para o desenho de sistemas de diagnóstico, como também para a geração de produtos para a prevenção e tratamento de diferentes doenças, tanto humanas como veterinárias (CHACANA *et al.*, 2004; SCHADE & CHACANA, 2007).

A utilização da imunidade passiva como terapia antimicrobiana foi uma prática desenvolvida no século XX. Porém, sua utilização foi deixada de lado parcialmente devido ao surgimento de antimicrobianos por volta dos anos 30 (CASADEVALL, 1996).

Por razões diversas, houve uma retomada na utilização da IgY a partir de 1980, tais como, substituição da utilização de anticorpos de mamíferos obtidos de maneira tradicional (CHACANA *et al.*, 2004); utilização de métodos experimentais cada vez menos invasivos em animais de laboratório vislumbrando o bem-estar animal, rápido desenvolvimento de resistência de muitos microrganismos a agentes microbianos principalmente aos antibióticos (BERGHMAN *et al.*, 2005) desenvolvimento de novas técnicas celulares e moleculares pelas indústrias e pelos centros de pesquisa, tais quais anticorpos específicos anti-IgY marcados com fluoresceína, alcalina ou peroxidase (CHACANA *et al.*, 2004), houve uma retomada na utilização da IgY a partir de 1980.

Assim, a partir de 1980 o uso da IgY foi impulsionado, 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).

Desde 1996, segundo Schade *et al.* (2005), o conceito de “Tecnologia IgY”, criado em 1995 pelo Dr. Claus Staak, foi aceito internacionalmente pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (European Centre for the Validation of Alternative Methods – ECVAM) a fim de definir a obtenção e o uso da imunoglobulina Y, a partir de gema de ovo com o intuito de substituir a IgG de mamíferos como tentativa de se reduzir o sofrimento e morte de animais experimentais, com indicação do *Office Vétérinaire Federal* da Suíça (CHACANA *et al.*, 2004; SCHADE *et al.*, 2005)

Mais a frente serão demonstradas as vantagens do uso da IgY e sua aplicação na Medicina Veterinária e Medicina Humana, bem como suas funções e características.

3.4.1 A produção de IgY

Como os demais vertebrados, as galinhas também produzem anticorpos específicos para a proteção contra organismos invasores. A partir da estimulação antigênica sofrida e com capacidade apropriada das células T helper, as células B se diferenciam em células plasmáticas produtoras de anticorpos, sendo o desenvolvimento das células B nas aves diferente quando comparado dos mamíferos (SILVA *et al.*, 2010).

As células progenitoras dos linfócitos B migram da cavidade da gema para o baço por volta do 7º dia de desenvolvimento. Em torno do 9º dia migram para a Bursa de Fabricius e no 10º dia já se encontram na medula óssea. Estas células não proliferam no baço ou na medula óssea, visto que o sinal indutivo para promover seu crescimento apresenta-se apenas na bolsa de Fabricio (REYNAUD *et al.*, 1994).

As células B precursoras, originárias das células tronco, crescem primeiramente no saco vitelínico e, subsequentemente, na medula óssea. Essas células pré-B migram da medula óssea para um órgão único das aves denominado Bursa de Fabricius, localizado próximo à cloaca (TIZARD, 2002).

A Bursa de Fabricius alcança seu tamanho máximo entre 8-10 semanas após a eclosão dos ovos e involui gradativamente (CIRIACO *et al.*, 2003). A remoção cirúrgica da Bursa de Fabricius promove diminuição na concentração de anticorpos circulantes, o desaparecimento das células B e das células plasmáticas. A bursectomia no início do estágio embrionário leva à geração de poucas células precursoras, incapazes de produzir anticorpos específicos em resposta a um antígeno.

Tal órgão não é indispensável para a produção de moléculas de anticorpos, mas apresenta um papel crítico na criação, diversificação e expansão do repertório dessas moléculas. É na bursa que os genes das imunoglobulinas presentes na superfície nas células B são rearranjados e sua diversidade aumenta para que as aves possam responder a uma enorme variedade de antígenos nesse ambiente. Essa diversificação, isto é, o desenvolvimento do repertório de anticorpos, ocorre dentro dos folículos bursais, por um processo chamado de conversão gênica (RATCLIFFE, 2006).

Somente após o seu amadurecimento no microambiente da Bursa, as células B já maduras migram para os órgãos linfoides secundários, onde podem encontrar antígenos externos e secretar anticorpos. Os Linfócitos B e a célula originada após sua maturação, conhecida como plasmócitos, são células do tipo secretor altamente especializadas, cujos produtos exclusivos são glicoproteínas, as imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos. Essas células são encontradas em vários grupos de animais, incluindo mamíferos e aves (SILVA *et al.*, 2010).

Dependendo dos antígenos e do ensaio sorológico utilizado, os anticorpos são usualmente detectados no soro entre 4 a 8 dias após a administração do antígeno (TIZARD, 2002).

Anticorpos são glicoproteínas altamente conservadas, têm em sua estrutura geral quatro cadeias peptídicas, sendo duas pesadas e duas leves, e pertencem à superfamília das imunoglobulinas. Cada anticorpo é formado por dois pares de cadeia pesada e dois pares de cadeia leve, sendo, cada cadeia codificada pelo seu próprio locus gênico específico (TIZARD, 2002).

Ao contrário dos mamíferos, que possuem dois diferentes loci para codificar a cadeia leve (tipo kappa e lambda), as galinhas têm apenas um locus para cadeia leve (tipo lambda). E possuem também apenas um locus para cadeia pesada com três genes para região constante. Cada gene codifica uma cadeia pesada (μ , α e γ)

gerando três classes de imunoglobulina IgM, IgA e IgY, respectivamente (TIZARD, 2002). Daremos mais ênfase à imunoglobulina Y, tema desta revisão.

A imunoglobulina Y só não é maior que a IgM, ambas produzidas por galinhas (*Gallus domesticus*). Após seu gene V-C ser reorganizados nas células B, a IgY é continuamente sintetizada, secretada no sangue e transferida para a gema de ovo, onde é acumulada (WARR *et al.*, 1995).

A IgY produzida por galinhas transmite aos seus descendentes, até a maturação completa do seu próprio sistema imunológico uma imunidade humoral eficaz contra os patógenos aviários mais comuns (SILVA *et al.*, 2010).

Alem de ser o maior anticorpo produzido em galinhas, a IgY pode ser encontrada tanto no sangue circulante na concentração de 4,5 a 5,0mg/mL (SUN *et al.*, 2001), quanto na gema de ovo com 100 mg / gema de ovo, aproximadamente. Também podendo ser encontrada no conteúdo duodenal, secreção traqueal e no líquido seminal (LESLIE & CLEM, 1969).

A IgY tem seu peso molecular girando em torno de 180 Kda. A cadeia leve tem uma média de peso de 18 Kda e o seu fragmento Fab, pesa em torno de 45 Kda (SUN *et al.*, 2001). Sua cadeia pesada, com peso molecular de 65-105 Kda, apresenta certa homologia entre seus domínios constantes com os da IgG de mamíferos, mesmo possuindo um domínio constante a mais (BIZANOV; JONAUSKIENE, 2003).

Em avestruzes existem poucos trabalhos descritos na literatura. Cadman *et al.* (1994) descrevem que o peso molecular da cadeia pesada da IgY extraídas do soro destas aves apresenta 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).

Além desse domínio constante a mais, a região de dobradiça da IgY não é desenvolvida como na IgG de mamíferos, embora, os resíduos de prolina (ácido pirrolidino-2-carboxílico) e glicina existentes entre as regiões Cy1- C2 e Cy2- Cy3 possibilitam a flexibilidade limitada do fragmento Fab da IgY (NARAT, 2003).

Estudos estruturais e da sequência proteica indicam que a IgY ocorre nas classes dos anfíbios, répteis e aves, diferentemente da IgG, presente somente em mamíferos (WARR *et al.*, 1995). A molécula IgY é mais hidrofóbica do que a IgG, apresentando ponto isoelétrico entre 5,7-7,6, e é mais sensível à desnaturação ácida (perde completamente sua atividade na faixa de pH entre 3 e 4) do que a desnaturação térmica, sendo estável à temperatura até 60°C (JARADAT & MARQUARDT, 2000).

Apresenta estabilidade variável em diferentes temperaturas de conservação, mantida em temperatura ambiente, a meia vida da IgY é superior a 6 meses e a 37°C é de apenas 1 mês. Quando congelada a -70°C por 12 meses, a IgY perde aproximadamente 50% de sua atividade, enquanto congelada a -20°C, pelo mesmo período, a perda é mínima (LEE *et al.*, 2002).

A IgY é estável a pH 4-9 e também é estável a 65 ° C em condições aquosas (SHIMIZU *et al.*, 1992 *apud* KARLSSON *et al.*, 2004). No entanto, as condições salinas elevadas ou adição de reagentes estabilizantes, como por exemplo, o açúcar que aumenta a resistência ao calor em pH ácido extremo e em alta pressão (SHIMIZU *et al.*, 1994, ZHANG, 2003 *apud* KARLSSON *et al.*, 2004).

3.4.2 Resposta de anticorpos

A resposta de anticorpos em aves é geralmente similar à observada em mamíferos. A IgM é formada predominantemente durante a resposta imune primária, sendo detectada 72 horas após a inoculação de um antígeno. Entretanto, a resposta é curta. Após uma única inoculação do antígeno proteico, ocorre um pico de IgM entre o 4º e 8º dias, que declina rapidamente e é acompanhada pela produção de anticorpos IgY. Entretanto, a qualidade e a proporção desta resposta dependem de diversos fatores, como: dose do imunógeno, tipo de adjuvante, via de aplicação, linhagem da galinha, idade e manejo (SCHADE *et al.*, 2005).

A dose de antígeno utilizada para a imunização é bastante variada. Vários autores tiveram bons resultados utilizando 0,010 a 1,0 mg de antígeno ou então 10⁹ células/mL, no caso de bactérias. Esta dose pode ser associada a um adjuvante para melhorar a resposta imunológica (AMARAL *et al.*, 2002).

Os adjuvantes são moduladores que estimulam as células B de forma independente e não específica. Eles promovem resposta imune celular e humoral e induzem uma memória imunológica de melhor magnitude. O processo inflamatório local gerado pelos adjuvantes possibilita uma liberação prolongada do antígeno tendo desta forma um efeito prolongado. O adjuvante mais empregado em experimentação animal é o adjuvante de Freund, sendo mais tolerado em galinhas do que em coelho (SCHADE *et al.*, 2005).

Atualmente, a via de administração mais comum para a imunização em galinhas é a intramuscular, mas há autores que utilizam outras vias, como: subcutânea, endovenosa ou oral. No caso da via endovenosa, não se pode associar o adjuvante e a aplicação, e deve ser feita de forma lenta para evitar choque anafilático (SCHADE *et al.*, 2005).

Há 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 como uma alternativa às inoculações via injeções. Neste estudo os autores concluíram que quando comparadas com as tradicionais inoculações subcutâneas as inoculações orais podem competir em iguais condições.

Em avestruzes, Adachi *et al.* (2008) descrevem a imunização via intramuscular na região lombar das aves. Nesse estudo os autores citam a administração de 30 a 50µg/ave de hemaglutinina (HA) do vírus da gripe H5N1 emulsificada em Adjuvante Completo de Freund. Os resultados encontrados sugerem que a dose administrada foi suficiente para alcançar altos títulos contra HA no soro e na gema das aves.

Os níveis de nutrientes ótimos para o crescimento, ganho de peso e conversão alimentar máximo não são suficientes para uma resposta imune adequada (KLASING, 1998). Para alcançar uma resposta imune eficiente, são necessários níveis mais altos de alguns ingredientes do que realmente é recomendado para crescimento e produção. Por outro lado, alguns elementos presentes na dieta das aves podem alterar a resposta imune, como: metais pesados, micotoxinas e contaminantes (MORGULIS, 2002).

A seleção genética, objetivando inicialmente o ganho de peso e a conversão alimentar, acabou por selecionar aves que produzem menos anticorpos que os das linhagens utilizadas na década de 50. Os hormônios também são capazes de alterar

diversos parâmetros da resposta imune; desta forma aves altamente produtoras de anticorpos possuem baixos níveis de testosterona (MORGULIS, 2002).

O manejo incorreto promove a liberação de altas cargas de corticosterona, podendo ocasionar a involução dos tecidos linfoides (timo, Bursa de Fabricius e baço) e a supressão da imunidade humoral e celular. Por isso, os cuidados com o manejo de luz, alimentação, higiene e vacinações se iniciam nas primeiras semanas de vida (EDANS *et al.*, 1983; SIEGEL, 1971).

3.4.3 Composição da gema do ovo.

A gema do ovo é constituída de matéria seca (51,3%) e água (48,7%), totalizando 36% de um ovo fresco de galinha. Seus principais componentes são lipídios e proteínas, em torno de 65% e 33% do peso seco da gema, respectivamente. Os lipídios da gema estão exclusivamente associados às proteínas e são compostos de triglicerídeos (62%), fosfolipídeos (33%), colesterol (< 5%) e carotenoides (<1%). As proteínas estão presentes na forma livre ou como apoproteínas (associadas a lipídeos). Essa interação entre proteínas e lipídios resulta na formação de lipoproteínas de baixa e alta densidade, os quais representam o principal constituinte da gema. Desta forma, com base no seu peso seco, a gema é formada por cinco constituintes principais: 68% de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), 16% de lipoproteínas de alta densidade (HDL), 10% de proteínas globulares (livetinas), 4% de fosfoproteínas (fosfovitina) e 2% de proteínas menores (ANTON, 2007).

A gema pode ser facilmente separada em duas frações após diluição com NaCl a 0,3M e uma centrifugação a 10.000 xg, por 30 minutos. Por este método, pode-se observar um sobrenadante amarelo escuro, chamado plasma, e um sedimento pálido, denominado grânulo. Os grânulos representam 19-23% do peso seco da gema, contendo em torno de 70% de HDL, 16% de fosfovitina e 2% de LDL. O plasma representa 77-81% do peso seco da gema, sendo compostos de 85% de LDL, 15% de livetina (ANTON, 2007).

3.4.4 Transferência passiva de IgY do soro para a gema do ovo.

A transferência de imunoglobulinas da mãe para o filho é comum em muitas espécies de vertebrados (ELAINE ROSE & ORLEANS, 1981). Em mamíferos, esta transferência passiva ocorre no útero ou após o nascimento, por meio da ingestão do colostro ou leite. Em ambos os casos, a IgG é transportada através de uma barreira celular, via transcitose, por um receptor específico para a fração constante da IgG, denominada FcRn (GHETIE & WARD, 2000). Todavia, a transferência passiva da imunidade não está restrita aos mamíferos (GRINDSTAFF *et al.*, 2003), ocorrendo também em aves, em répteis e em peixes (GRINDSTAFF *et al.*, 2003; SILVA & TAMBOURGI, 2010).

A secreção da IgY no pintinho jovem começa no 6^o dia após a incubação. A IgY secretada pelas células B maduras é entregue diretamente para a circulação, atingindo uma concentração constante de 1.0 a 1.5mg/mL de soro (DAVIES *et al.*, 1995; NARABARA *et al.*, 2009). Ao longo da vida produtiva da galinha, a concentração da IgY no soro é mantida devido a um equilíbrio estável resultante de sua síntese continuada em contiguidade aos processos de transferência para a gema.

A quantidade transferida está relacionada com a concentração no soro sanguíneo da galinha, sem nenhum tipo de seleção prévia para sua especificidade (MORRISON *et al.*, 2001; KITAGUCHI *et al.*, 2008). Quando o ovo passa pelo oviduto, a IgM e a IgA presentes nas secreções do oviduto são incorporadas, junto com a albumina, à clara do ovo, em quantidades limitadas (CARLANDER *et al.*, 2002).

A vida média da IgY na circulação de uma galinha adulta é curta e varia entre aproximadamente 36 a 65 horas. A concentração de IgY na gema independe do tamanho do ovo e é proporcional à concentração de IgY no soro materno, podendo variar entre 10 e 20 mg/mL de gema e de 100 a 400 mg de IgY por ovo. Esta variação depende da linhagem genética ou raça da ave e do seu biorritmo (CARLANDER *et al.*, 2002).

3.4.5 Purificação de IgY

Diversas técnicas, separadamente ou em combinação, podem ser utilizadas para isolar a IgY da gema com o objetivo de se obter quantidade, pureza e/ou atividade biológica. A extração de IgY pode ser obtida por precipitação com sais, cromatografia de afinidade ou ultrafiltração, mas primariamente utilizam-se solventes orgânicos, substâncias hidrófilas ou congelamento a -20 °C, para separar a fase aquosa da gema, onde se encontra a IgY, da fase lipídica (STAAK *et al.*, 2001).

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 ante esses diferentes métodos varia entre 10 e 20mg/mL, podendo-se encontrar 100 a 400mg de IgY por ovo, variação que depende de fatores como a raça da ave, o tamanho do ovo e as variações fisiológicas individuais (AKITA & NAKAI 1993; MCLAREN *et al.*, 1994; CHACANA *et al.*, 2004). Recentemente, Hodek *et al.* (2013) demonstraram que pela metodologia de extração de IgY por sulfato de sódio (8,8%), a obtenção de IgY com grau de pureza em aproximadamente 97%.

Em outras aves como codornas, a purificação de IgY a partir da gema de ovos apresentou em média 7.467,5µg/mL. Esta IgY quando dissociada apresentou bandas de 25 e 65 kDa para as cadeias leves e pesadas, respectivamente, por meio de SDS-PAGE (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em avestruzes Adachi *et al.* (2008) afirmam que é possível a obtenção de até 200mg 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.

O polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) é um polímero de alto peso molecular formado a partir do etileno glicol. O uso desse polímero para extração de IgY da gema foi introduzido por Polson *et al.*, 1980, sendo considerado um método padrão. Akita e Nakai, em 1993, utilizaram o PEG-6000 para precipitação da IgY, em função

da vantagem de se trabalhar em temperatura ambiente, sem nenhum risco de desnaturação do anticorpo.

Outros métodos de purificação vêm sendo empregados isoladamente ou em conjunto: precipitação com sulfato de amônio (SCHWARZKOPF & THIELE, 1996); ácido caprílico (MACLAREN *et al.*, 1994; CHACANA, *et al.*, 2003), sistemas de ultrafiltração (KIM & NAKAI, 1998) e cromatografia de afinidade (MEULENAER & HUYGHEBAERT, 2001). A escolha de um ou outro método de extração irá depender da infraestrutura de cada laboratório, considerando suas facilidades e limitações como também, o grau de pureza e o rendimento do processo.

3.4.6 Vantagem do uso da IgY e sua utilização como imunobiológico.

Existe uma vasta diferença filogenética entre as espécies de aves e mamíferos e, 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 (LARSSON *et al.*, 1992).

Devido à distância genética entre aves e mamíferos, antígenos de mamíferos inoculados em aves geram uma resposta imune forte, com elevada afinidade e avidéz, sendo necessárias menores quantidades de antígenos e de tempo de inoculação, quando comparados aos utilizados nos mesmo processos com uso de mamíferos (GASSMANN *et al.*, 1990; WOOLLEY & LANDON, 1995). Por esta razão, o uso de mamíferos não é viável na produção de anticorpos para proteínas altamente conservadas de mamíferos. Com a distância evolutiva entre aves e mamíferos, proteínas conservadas de mamíferos têm maior probabilidade de serem detectadas como “não próprias” pelo sistema imune de uma ave, que pode ainda detectar mais epítomos nessas mesmas proteínas.

Os anticorpos produzidos pelas aves não se ligam a receptores Fc de mamíferos e, portanto, não ativam o sistema complemento humano (LARSSON *et al.*, 1992). A capacidade de a IgG ativar o complemento pode influenciar nos resultados de um teste imunológico. Segundo Campbell *et al.* (1980), quando há ativação da cascata do complemento, o componente C4 ativado pode ligar-se ao

fragmento Fab da IgG, podendo interferir com a ligação do antígeno e gerar resultados subestimados ou falso-negativos. Gigli e Austen (1971), constataram que a IgY é incapaz de ativar as proteínas dos sistema complemento do soro de coelhos, cobaias, bovinos, ratos, caprinos, cães e gatos, por não se ligar ao componente C1 do complemento.

Fatores reumatoides são reconhecidamente uma das causas mais frequentes de reações inespecíficas em testes imunológicos para pesquisa de IgM. Em testes de ELISA indireto, esta ligação pode ocasionar resultados falso-positivos; contudo, a IgY não tem afinidade com fatores reumatoides e, por isso, não é capaz de gerar resultados falso-positivos no ELISA por esta via (LARSSON *et al.*, 1991).

Proteínas A de *Staphylococcus* e G de *Streptococcus* são proteínas bacterianas amplamente usadas com imunoabsorventes em ensaios imunológicos devido à sua habilidade de se ligar ao Fc da IgG. Entretanto, estas proteínas podem constituir um problema, quando encontradas em amostras bacterianas. Neste caso, sua ligação a anticorpos com especificidade para outros tipos bacterianos pode ocorrer, levando a resultados falso-positivos. Hoffman *et al.* (1996) demonstraram que a IgY não reage com tais proteínas e, assim, não interfere, em testes imunológicos em que estas proteínas estão presentes. Devido à diferença evolucionária, anticorpos de galinhas se ligam a mais epítomos em uma proteína de mamífero do que o anticorpo correspondente em mamíferos (CHACANA *et al.*, 2004).

De acordo com Chen *et al.* (2002) e Camenisch *et al.* (1999) as principais vantagens da produção de anticorpos em ovos de galinha é que não se trata de um método invasivo, visto que os antígenos de mamíferos são mais imunogênicos em frangos devido a fatores filogenéticos, e à facilidade e rapidez no isolamento das moléculas de IgY do ovo.

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).

Outras vantagens do uso da IgY são o baixo custo da criação e a 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 & NAKAI, 1993).

3.4.7 Utilização da IgY

Várias publicações têm descrito o sucesso na utilização de IgY em inúmeras pesquisas (HUOPALAHTI, *et al.*; 2007; DAVIS & REEVES, 2002; SCHADE, *et al.*; 2001; CARLANDER, 2002 e GASSMAN, *et al.*; 1990). Ensaio imunoenzimáticos utilizando IgY são usados para dosagem de proteínas e peptídeos por meio de ELISA e fluorescência, dentre outros, utilizados em pesquisas básicas.

A IgY é utilizada com sucesso na detecção de antígenos de origem viral, bacteriana, vegetal e animal para avaliar a incidência de parasitos intestinais em animais domésticos (HUOPALAHTI, *et al.*; 2007; SCHNIERING, *et al.*; 1996) e a contaminação de alimentos com toxinas e drogas (PICHLER, *et al.*; 1998). Na década de 90 a IgY foi amplamente utilizada na terapia e profilaxia de doenças e também como um novo contexto na fabricação dos chamados alimentos funcionais (HUOPALAHTI, *et al.*; 2007).

Segundo Davis e Reeves (2002), as imunoglobulinas de origem aviária são muito visadas na imunoterapia oral em humanos e animais devido às suas características de não ativação do complemento e não interação com receptores Fc de mamíferos, o que evita o aparecimento de uma resposta inflamatória no trato gastrointestinal. Seus efeitos benéficos têm sido vistos na prevenção de várias afecções, como a cárie dental, a diarreia por rotavírus e úlceras gástricas provocadas por *H. pylori* em humanos, sendo capaz de bloquear a ligação de *Escherichia coli* em receptores de mucosa e de inibir o crescimento da mesma *in vitro*. Além disso, o uso conjunto de anticorpos e drogas pode ser um importante agente no tratamento do câncer.

Velarde *et al.* (2007) produziram soro anti-veneno botrópico em galinhas e constataram que a IgY foi capaz de neutralizar a toxicidade do veneno em um teste de neutralização *in vivo*, mas a potência do antiveneno botrópico foi menor do que a potência do soro antibotrópico comercial produzido em equino.

Motoi *et al.* (2005) produziram IgY anti-rábico para utilização na imunofluorescência indireta para diagnóstico de raiva. Constataram que as IgY produzidas e purificadas por precipitação com sulfato de sódio foram capazes de reagir com proteínas virais presentes em monocamadas de células infectadas.

Ribeiro *et al.* (2007) descrevem o fornecimento de gema de ovos de galinha hiperimunizadas contra *Escherichia coli* patogênica para suínos avaliando a imunidade passiva de leitões recém-nascidos. Os resultados desse estudo sugerem que o uso de gemas de aves hiperimunizadas contra *E. coli* age efetivamente na prevenção da diarreia dos leitões, sendo seu uso contínuo mais vantajoso que o fornecimento somente ao nascer.

Malik *et al.* (2006) descrevem a utilização de IgYs purificadas 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 a do grupo-controle. Este fato, portanto, demonstra que o uso de IgY purificada pode ser utilizado como uma ferramenta terapêutica no tratamento da doença de Gumboro em aves infectadas.

A tabela 1 resume alguns trabalhos de outros autores que utilizaram a IgY para diagnóstico.

Autores	Objetivos	Conclusão	Vantagens observadas
Staak, 1996	Produção de conjugados anti-espécies para ELISA e RIFI	Resultados satisfatórios	Econômica Bioética
Hlinak <i>et al.</i> (1996)	Conjugado para diagnóstico de <i>Bordetella bronchiseptica</i> utilizando ELISA e RIFI	Resultados satisfatórios	IgY pode substituir IgG no ELISA e no RIFI
Juliarena <i>et al.</i> (2007)	Conjugado para diagnóstico de Leucose Bovina em ELISA	Resultados satisfatórios	Ausência de reações cruzadas
Plessis <i>et al.</i> (1999)	Conjugado para uso em ELISA indireto no diagnóstico de Doença Africana Viral em equino	Resultados satisfatórios	Ausência de reações cruzadas
Lee <i>et al.</i> (2004)	Conjugado para uso em ELISA para a detecção de interleucina em suínos	Alta sensibilidade	Reconhece proteínas conservadas de mamíferos
Cipolla <i>et al.</i> (2001)	Conjugado fluorescente anti- <i>Campylobacter fetus</i>	Alta sensibilidade	Menor fluorescência inespecífica
Ntakarutimana <i>et al.</i> (1992)	Conjugado anti-transferrina humana	Alta sensibilidade	Econômica
Kuns <i>et al.</i> (1991)	Diagnóstico de Clamydia em aves	Algumas reações inespecíficas impedem seu uso em alguns tecidos de aves	Não há

Tabela 1: Utilizações de IgY em diagnóstico segundo alguns autores

3.5 A Proteína Recombinante LACK

A Proteína LACK é uma proteína de 36 kDa (312 aminoácidos), membro da família de proteínas WD40, com repetições de triptofano ácido aspártico, presente nos diferentes estágios do ciclo de vida da *Leishmania* e com alto grau de homologia entre as diferentes espécies do parasito (MOUGNEAU *et al.*, 1995; OKUNO *et al.*, 2002). A LACK possui localização intracelular, apresentando distribuição celular próxima ao cinetoplasto das espécies de *Leishmania*. Apesar da localização

cinetoplástica, não está ligada às estruturas de membrana, e exibe afinidade por complexos multiproteicos. Assim, uma das características principais desta proteína é se apresentar ligada a múltiplas proteínas citoplasmáticas (GONZALES-ASEGUINOLAZA *et al.*, 1999).

A LACK exibe homologia com receptores de proteína quinase C ativada de mamíferos, ou RACKs, pertencentes a uma família de proteínas regulatórias, além de ser expressa tanto no estágio promastigota quanto no amastigota com níveis de transcrição dos genes LACK similares em ambos os estágios (MOUGNEAU *et al.*, 1995).

Ainda não foi definida a função da proteína LACK em *Leishmania*, mas estabeleceu-se que ela possui afinidade por proteínas envolvidas na replicação de DNA e síntese de RNA. Sua sequência possui também um padrão hidrofóbico, com ausência de sequência de aminoácidos hidrofílicos (GONZALES-ASEGUINOLAZA *et al.*, 1999).

A proteína LACK pode ser utilizada no diagnóstico de LV por intermédio da utilização do anticorpo anti-LACK que é um marcador imuno-histoquímico altamente sensível e específico (HOFMAN *et al.*, 2003).

Uma das perspectivas do uso da LACK é o uso como vacina contra a LV e Sinha *et al.* (2013) realizaram uma análise abrangente de várias sequências da LACK e determinaram as regiões de identidade, similaridade e antigenicidade da proteína que irá ajudar no desenvolvimento de uma vacina contra todas as formas de LV.

4 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral é uma doença de grande importância epidemiológica no Brasil e o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas, como a utilização de IgY e antígenos específicos, é de grande importância para um diagnóstico preciso, evitando-se reações cruzadas e resultados falso-positivos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 A produção da proteína recLACK

A proteína recombinante LACK (recLACK) de *L. chagasi* L579, nos estágios pro e metacíclicos foi cedida gentilmente pelo Professor Enrique Medina-Acosta.

As bactérias transformadas utilizadas foram de *E. coli* DH5 α , cepas SG13009, M15, que contêm o plasmídio pREP4.

O DNA genômico de *L. chagasi* total foi obtido empregando-se o método rápido de extração de DNA (MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1993). A partir do DNA genômico a clonagem do gene LACK no plasmídio foi feita a partir do isolamento por PCR da sequência codificadora do gene LACK amplificada por PCR com indicadores desenhados a partir da sequência publicada para o gene LACK de *L. major* (MOUGNEAU *et al.*, 1995).

As células competentes, *E. coli* DH5 α , contendo plasmídio repressor pREP4, que confere resistência à canamicina, foram transformadas e para validar a clonagem no vetor pQE-30 foram realizadas digestão do DNA plasmidial extraídos de diferentes colônias com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III para identificar as colônias que continham um único sítio interno e característico do gene LACK. O DNA plasmidial selecionado foi submetido ao sequenciamento parcial do inserto para confirmação genética.

Após a validação os clones selecionados foram testados para expressão da proteína recombinante, cujo padrão de proteínas dos lisados foi determinado por meio de SDS-PAGE. A sua purificação foi realizada em coluna de afinidade Ni-NTA-Agarose e quantificada pelo método do ácido bicinconínico.

Para analisar a expressão da proteína LACK foram produzidos anticorpos policlonais em coelho e extratos de *Leishmania* realizando posteriormente a imunodeteccção. A imunodeteccção, pelo método de ELISA, foi realizada com dez amostras de soro canino de área endêmica.

5.2 Obtenção dos ovos após imunização da ave

Os itens 5.2.1 a 5.2.4 e 5.3.1 a 5.3.3 descritos a seguir foram desenvolvidos por Tobias (2011).

O projeto foi aprovado pela comissão de ética de uso de animais (CEUA-UENF), sob o número de protocolo N° 034 em 11 de novembro de 2008.

5.2.1 Imunização da ave

Uma fêmea de avestruz foi imunizada (figura 3) com a recLack de *Leishmania chagasi* (200 μ g por imunização) contendo adjuvante completo de Freund (AFC), injetada via intramuscular, no músculo braquial na região da asa das aves em intervalos de 21 dias, perfazendo um total de três imunizações. A ave utilizada pertence à Fazenda de criação de avestruzes denominada “Estação do Avestruz” localizada no município de Saquarema no Estado do Rio de Janeiro.



Fonte: TOBIAS (2011)



Fonte: TOBIAS (2011)

Figura 3 - Avestruzes utilizadas no experimento (A) e local da inoculação da proteína recombinante (B).

5.2.2 Coleta de sangue e Armazenamento do soro da ave

As amostras de sangue da ave foram colhidas pré-inoculação, com três imunizações a cada 21 dias utilizando-se tubos de *vacutainer* por punção da veia jugular ou veia braquial. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas sob refrigeração e transportadas para o 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, armazenado em freezer -20° C até a utilização.

5.2.3 Coleta dos ovos

Foram colhidos dois ovos, após a imunização, para obtenção de IgY e quantificação destas imunoglobulinas nas amostras. Cada ovo foi acondicionado sob refrigeração até o momento do processamento do material para extração de IgY.

5.2.4 Separação da gema e congelamento

As gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com PBS, pH 7,2. O seu conteúdo foi removido por punção com pipeta de Pasteur e transferido para recipientes estéreis e congeladas a -20°C até o uso.

5.3 Produção de anticorpos anti-avestruz por meio da inoculação de IgY purificada em coelhos e cabra

5.3.1 Imunização dos animais (coelhos e cabra) com IgY purificada para produção de anti-IgY

Após a IgY ser extraída e purificada pelo método descrito no item 5.4.1, a solução foi submetida à purificação com coluna de afinidade (HiTrap™ IgY- GE) com capacidade para 5 mL e capacidade de ligação de até 100 mg de IgY pura.

A imunização foi realizada de acordo com Tobias (2011). 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 (REMFROY, 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). Inicialmente uma suspensão contendo 0,5mg/mL de IgY foi emulsionada com adjuvante completo de Freund (ACF) (vol/vol) e inoculada 0,5 mL por via subcutânea na região da coxa em cada animal. Vinte e um dias após foi realizado o primeiro reforço, utilizando a mesma dose, via e local de aplicação, porém com adjuvante incompleto de Freund (AFI). Após um intervalo de 14 dias, foi inoculada a terceira dose por via intradérmica na região dorsal com 2mg/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 (1mL por animal sendo 0,25mL por ponto). De cada animal foi colhido sangue antes de cada inoculação e 15 dias após a última inoculação, o sangue foi colhido via jugular na cabra e na auricular nos coelhos e os soros foram armazenados a -20°C até o seu processamento.

5.3.2 Purificação do soro hiperimune (IgG) de coelho e cabra utilizando ácido caprílico e sulfato de amônia

O protocolo para purificação de IgG do soro de coelhos e cabra utilizando ácido caprílico foi uma adaptação daquele utilizado por Russ et al. (1983) realizado por Tobias (2011). O soro (10 mL) foi diluído 1:3 em tampão acetato de Sódio pH 4,0 e o pH da solução ajustada para 4,5. A seguir foi adicionado ácido caprílico (no coelho 0,75 mL/10 mL e na cabra 0,7 mL/10 mL de soro) lentamente sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente, e subsequente centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. Depois, o sobrenadante foi colhido e o pH ajustado para 7,0 com NaOH 1 M. Em seguida o sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000g/20 minutos. O sobrenadante desta fase foi precipitado lentamente sob agitação com sulfato de amônio até 45% p/v, deixando 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 5.000 g 25 por 15 minutos. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido com 1mL de água destilada e transferido para membrana de diálise onde foi submetido inicialmente à diálise por duas vezes com intervalo de 12 horas em água destilada e em seguida submetido a duas diálises com PBS com intervalo de 6 horas. Posteriormente as amostras foram aliquotadas e congeladas a -20°C.

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

O soro foi purificado utilizando ácido caprílico. A solução contendo IgG foi submetida à purificação com coluna de afinidade com capacidade para 1mL e capacidade de ligação de até 25 mg de IgG. Após, para a biotinylação foi utilizada uma coluna de gel filtração com capacidade de ligação de até 10mg/mL (Kit Immunoprobe Biotinylation – Sigma).

5.4 Procedimentos realizados utilizando a IgY e recLack

5.4.1 Purificação de anticorpos IgY de gemas de ovos da avestruz

O protocolo para purificação de IgY de gemas de ovos de avestruzes foi o mesmo utilizado por Tobias (2011). As gemas foram diluídas com água destilada na proporção de 1:10 (v:v) e em seguida acidificadas deixadas em repouso por 16 horas a 4° C. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 xg por 30 minutos 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). As soluções foram mantidas à temperatura ambiente, sob agitação, por duas horas e centrifugadas a 10.000 xg por 30 minutos. As soluções purificadas da gema contendo IgY, passaram por diálises contra PBS, e em seguida submetidas à filtração esterilizante (0,22µm). Posteriormente as amostras foram aliqotadas e congeladas a -20°C até o uso (Figura 4).

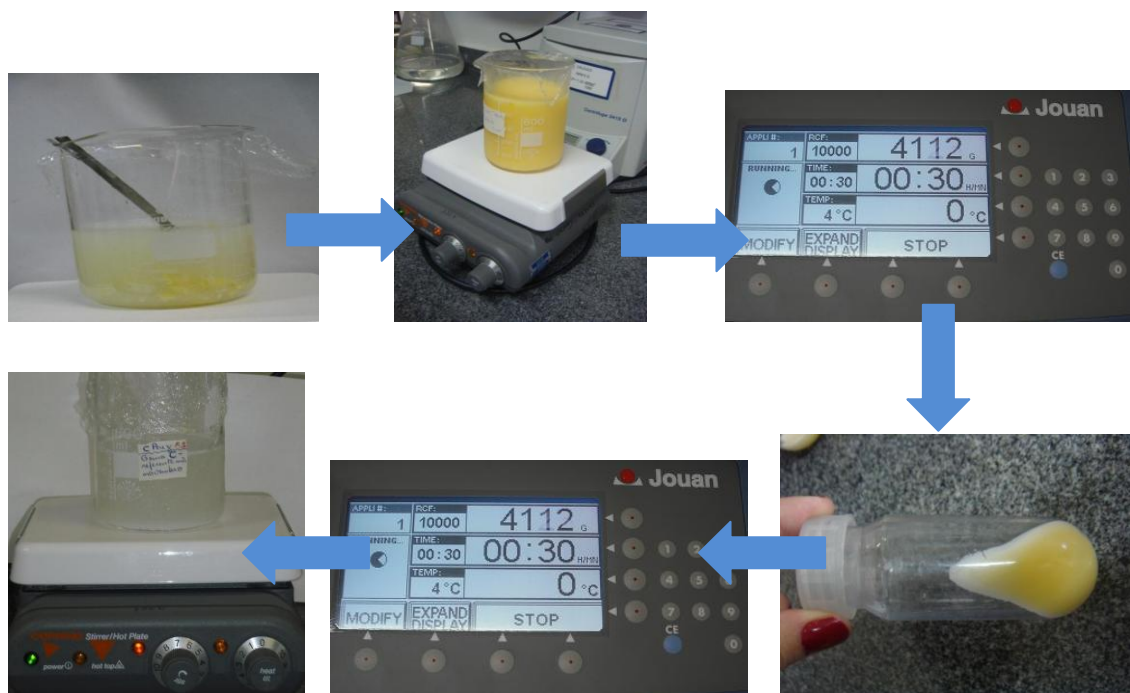


Figura 4 – Diluição das gemas em água destilada, centrifugação e diluição do sobrenadante em Sulfato de amônia a uma proporção de 20% (p/V).

5.4.2 Quantificação de proteínas

Por meio de dosagem, foi realizada a quantificação de proteínas, pelo método do Ácido Bicinconínico (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 seis poços com duplicata, possuindo respectivamente 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL do BSA em 10, 8, 5, 6, 4, 2, 0 µL de PBS, acrescentando 200 µL do reagente na proporção de 50 partes de ácido bicinconínico para uma parte de sulfato de cobre II penta-hidratado. As amostras foram diluídas 1:100 e transferidas no volume de 10 µL em poços duplicados. Por último, adicionados 200 µL aos poços da placa contendo o reagente ácido bicinconínico 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.

5.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os extraídos obtidos resultantes do processo de purificação das proteínas (com Sulfato de Amônio e Sulfato de Sódio em cada gema), e a proteína recombinante RecLack, foram submetidos à análise eletroforética em SDS-PAGE. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em sistema descontínuo (Bio Rad Mini 20 Protean II, USA), constituído de gel separador a 12% de acrilamida, gel de empilhamento a 4% de acrilamida e tampão de corrida Tris-Glicina, segundo metodologia descrita por Laemli (1970). As amostras foram preparadas em tampão de amostra, 100°C por 5 minutos, aplicadas no gel em volumes de 10µL por canaleta, e submetidas a uma corrente inicial de 100V/60mA por 50 a 60 minutos. O marcador de peso molecular utilizado foi BenchMark™ Protein Ladder (Novex). Após a corrida, o gel foi corado com azul de “Coomassie”, 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.

5.4.4 Amostras de soro de caninos

Para a avaliação do ELISA utilizando RecLACK como antígeno foram utilizadas amostras de soros de cães domésticos (*Canis familiaris*) gentilmente cedidos pela Dra. Eliame Mouta, do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Ipec/Fiocruz. Não houve necessidade de submissão desta parte do trabalho à Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA-Fiocruz por se tratar de amostras de soros provenientes de um estudo previamente aprovado, com licenças de número: P286/06 e L023/06. Os soros selecionados foram divididos em dois grupos:

Grupo I - LVC: amostras provenientes de cães com LV com presença de *L. (L.) infantum chagasi*. As amostras foram coletadas em área endêmica para a doença, na região metropolitana de Belo-Horizonte, Minas Gerais. Na ocasião da coleta, os animais deste grupo foram submetidos à retirada de fragmentos de pele íntegra para a detecção de parasitos por meio de cultura e isolamento, determinando-se a espécie por eletroforese de isoenzimas (CUPOLILLO *et al.*, 1994). Esses animais foram ainda submetidos à coleta de sangue para realização de testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta (kit IFI-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) e ELISA (kit EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) apresentando resultados positivos.

Grupo II – Controles: amostras provenientes de cães aparentemente saudáveis, sem detecção de *L. (L.) infantum chagasi*. As amostras foram coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, área de transmissão esporádica para a doença humana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Na ocasião da coleta, os animais deste grupo foram submetidos à retirada de fragmentos de pele íntegra para a detecção de parasitos por meio de cultura e isolamento, que determinou a ausência dos mesmos. Esses animais foram ainda submetidos à coleta de sangue para a realização de testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta (kit IFI-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) e ELISA (kit EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz) apresentando resultados negativos.

5.4.5 Tamanho da amostra

Para o presente estudo foram utilizadas 72 amostras de soro canino positivo para LVC e 72 amostras negativas.

5.4.6 A produção do Extrato Bruto Total de *L. (L.) infantum chagasi*

O extrato bruto total de *L. (L.) infantum chagasi* utilizado no ELISA foi cedido pelo Dr. Valmir Laurentino Silva e Dra. Fernanda Nunes Santos do Laboratório de Imunodiagnóstico, DCB/ENSP/FIOCRUZ, que foi obtido de acordo com o protocolo a seguir. Com a finalidade de obtenção de massa parasitária, 5mL de culturas de promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram transferidas para garrafas de cultura de células (Techno Plastic Products - TPP, Suíça) contendo 50 mL de Schneider's suplementado incubados a 28°C por aproximadamente 3 dias. Após esse período as culturas foram quantificadas e repicadas para 300 mL de Schneider's suplementado, mantendo um inóculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL. Após 4 dias de incubação, período inicial da fase estacionária de crescimento (RIBEIRO *et al.*, 2006), as promastigotas foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos e lavadas três vezes em solução salina estéril (NaCl a 0,9%). A suspensão celular resultante da última lavagem foi ressuspensa em tampão PBS com inibidores de protease contendo 1mM de Iodoacetamida, 1 mM de Fenantrolina e 1 mM de PMSF (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Posteriormente, foi realizada a lise celular constituída por dez ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento em solução contendo uma parte de gelo seco e uma parte de etanol absoluto (VETEC-Brasil), seguidos por um processo de sonicação, com somente um ciclo de 45 minutos a 65 Hz. Após tal procedimento, o extrato bruto foi submetido à centrifugação por 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C e submetido à mensuração proteica (LOWRY, *et al.*, 1951) e estocagem a -20°C até o uso.

5.5 ELISA

5.5.1 Padronização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) utilizando recLack

O ensaio de ELISA foi realizado seguindo modificações dos métodos de Voller *et al.* (1976); Hommel *et al.* (1978) e Coutinho *et al.* (1985). Placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc, EUA) foram cobertas com 100 µL/poço de recLack em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) testando as concentrações de 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,75 µg/mL, 0,875 µg/mL incubadas de 4 a 8°C por 16 horas em câmara úmida. Após três lavagens com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20) - PBST, foram adicionadas em volume de 100 µL/poço as amostras de soro canino de ambos os grupos de estudo diluídas 1:100 em solução de diluição PBST contendo 1% de caseína, 2% de caseína, 3% de caseína e 4% de caseína filtrado em papel de filtro seguido de incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBST, o anticorpo secundário IgG de coelho anti-cão SIGMA[®] foi adicionado em volume de 100 µL/poço diluído em solução de diluição PBST com 1% de caseína, 2% de caseína, 3% de caseína e 4% de caseína filtrado com papel de filtro nas concentrações 1:20.000, 1:40.000, 80.000, 1:160.000, seguido de incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens, a reação foi revelada protegida da luz, com 100 µL/poço solução reveladora 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB-Sigma Immunochemicals Co, St. Louis, EUA). Após 30 minutos, a reação foi paralisada com solução de ácido sulfúrico 1M, 50 µL/poço. Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Genius, Tecan), com filtro de referência de 450nm e de contraste de 620nm.

5.5.2 ELISA utilizando a IgY de avestruz anti-recLack ante recLack e extrato total de *L. (L.) infantum chagasi*

Foi utilizada uma Placa de ELISA (Maxi Sorb, Nunc, EUA) sensibilizada com 100µL extrato total de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração 20µg/mL, 10 µg/mL, 5µg/mL (em duplicata) em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6). Outra placa foi sensibilizada com 100µL de recLack na concentração 5 µg/mL em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6). Após 16 horas de incubação a 4 a 8°C a placa foi lavada três vezes com 200µL de PBST. Após tal procedimento, a IgY de avestruz anti-recLack (M4), na concentração 0,08g/mL com diluição em solução de PBST (contendo 1% de caseína, filtrada em papel de filtro) nas concentrações 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000 nos poços sensibilizados com extrato total. Nos poços sensibilizados com recLack, foram adicionadas as concentrações 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000 em solução de PBST (contendo 3% de caseína, filtrada em papel de filtro). Na coluna 1 foi colocada somente solução de caseína 1% - branco. Foram utilizados os controles o anticorpo de coelho anti-recLack (R14) e o soro pré-imune de coelho imunizado com recLack (R15) na diluição 1:20000. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens, o anticorpo secundário (IgG de coelho anti-IgY de galinha - marcado com peroxidase - Promega[®]) foi adicionado em volume de 100 µL/poço diluído em PBST contendo 3% de caseína para os poços sensibilizados com recLack e solução de PBST contendo 1% de caseína para os poços sensibilizados com extrato bruto nas concentrações 1:1000 e, em seguida de incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBST, a reação foi revelada protegida da luz, com 100 µL/poço de solução reveladora (TMB-Sigma Immunochemicals Co, St. Louis, EUA). Para o R14 e R15 foi utilizada Proteína A peroxidase na diluição 1:20000. Após 30 minutos, a reação foi paralisada com solução de ácido sulfúrico 1M, 50 µL/poço. Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Genius, Tecan), com filtro de referência de 450nm e de contraste de 620nm.

5.5.3 ELISA utilizando os antígenos reCLack e Extrato Bruto Total de *L. (L.) infantum chagasi* ante soros infectados e não infectados para LVC

O ELISA foi realizado seguindo modificações dos métodos de Voller *et al.* (1976); Hommel *et al.* (1978) e Coutinho *et al.* (1985). Placas de ELISA (Maxi Sorb, Nunc, EUA) foram cobertas com 100 µL/poço de reCLACK em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) na concentração de 5 µg/mL (metade da placa) e extrato bruto na concentração de 20 µg/mL (outra metade da placa), incubadas de 4 a 8°C por 16 horas em câmara úmida. Após três lavagens com PBST, foram adicionadas em volume de 100 µL/poço, amostras de soro canino de ambos os grupos de estudo (11 soros não infectados e 11 infectados para reCLack e 10 soros não infectados e 10 soros infectados para extrato bruto, todos em duplicata). As amostras, na diluição 1:100 em solução de PBST, contendo 3% de caseína, para os poços sensibilizados com reCLack e em solução de PBST contendo 1% de caseína, para os poços sensibilizados com extrato bruto. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Foi utilizado para cada sensibilizado um controle positivo e negativo para LVC e o branco (que nessa fase somente foi adicionado à solução de diluição). Após três lavagens, o anticorpo secundário IgG de coelho anti-cão SIGMA[®] foi adicionado em volume de 100 µL/poço, diluído em solução de PBST (contendo 3% de caseína, filtrada em papel de filtro) para os poços sensibilizados com reCLack e solução de PBST (contendo 1% de caseína, filtrado em papel de filtro) para os poços sensibilizados com Extrato Bruto na concentração 1:40.000 e, em seguida, incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBST, a reação foi revelada protegida da luz, com 100 µL/poço de solução reveladora (TMB-Sigma Immunochemicals Co, St. Louis, EUA). Após 30 minutos, a reação foi paralisada com solução de ácido sulfúrico 1M, 50 µL/poço. Para a análise, foi utilizado leitor de microplacas (Genius, Tecan), com filtro de referência de 450nm e de contraste de 620nm. Foram utilizados soros de coelho (R14) imunizado com reCLack e soro pré-imune (R15) como controle das reações ante reCLack.

5.5.4 Titulação por ELISA de IgY extraído das gemas dos ovos e de amostras de soros de avestruz ante reLack utilizando IgG anti-IgY de coelho e cabra biotinilados

Quatro placas de Elisa foram sensibilizadas com 50µL/poço de reLack em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6) na concentração de 2,0 µg/mL diluídas 1:1300. Após incubação de 1 hora a 37°C foram lavadas uma vez com 200µL de PBST. As placas foram bloqueadas com gelatina 1% diluída em PBS (PBSG) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com 200µL de PBST os poços foram então preenchidos com 120µL dos respectivos soros e IgY purificados de gema, diluídos em PBST + gelatina 1% (PBSTG) nas proporções de 1: 500 até 1:1093500 e incubados por 1 hora a 37°C. Após três lavagens com PBST os anticorpos anti-IgY de avestruz (coelho 1:1000 e cabra 1:2000) diluídos em PBS foram adicionados e novamente incubados a 37°C por 1 hora. Em seguida foram adicionados 50µL de avidina marcada com peroxidase na diluição 1:2000 e incubadas por 1 hora a 37°C. Após três lavagens com PBST a reação foi revelada pela adição de 50µL de substrato enzimático (3,25mL 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). Em seguida as placas foram incubadas por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz e a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 3N, e os resultados foram realizados por leitura em espectrofotômetro em DO 492nm (Thermo Scientific, USA).

5.6 Western Blot

5.6.1 Western Blot da proteína reLack ante soros infectados e não infectados para LVC

A proteína reLack foi separada por eletroforese em dois géis de policrilamida a 12% (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram constituídos de

dois tipos: um denominado de stacking gel (6%) e o outro de gel de separação (12%). A voltagem utilizada para eletroforese foi de 100V durante 1 hora e meia. A proteína foi então transferida para as duas membranas de nitrocelulose a 10V por 2 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, as membranas foram coradas com a solução Ponceau (0.1% p/v de Ponceau, 5% de ácido acético, diluídos cinco vezes em água) de forma a confirmar a eficiência da transferência da proteína. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução tampão salina fosfato (PBS) e 0,05% Tween 20 (PBST) e caseína a 1% p/v *over night* sob agitação de 4 a 8°C. Após o bloqueio, as membranas foram cortadas em tiras de aproximadamente 0,5cm e incubadas com os soros caninos (infectados e não infectados) nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 em PBST com caseína 1% *over night* sob agitação a 4 a 8°C. Após esse período, as membranas foram lavadas por três vezes, durante 5 minutos com PBST sob agitação a 4 a 8°C, e incubadas, com o anticorpo secundário IgG de coelho anti-cão SIGMA[®] na diluição de 1:1000 durante 2 horas sob agitação a 4 a 8°C. As membranas foram lavada novamente por três vezes com PBST, durante 5 minutos sob agitação a 4 a 8°C. Para revelação foi utilizada solução de revelação com 3,3 diaminobenzidina (DAB + peróxido de hidrogênio a 30 %, tampão citrato fosfato), até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com água destilada. Após obtenção do resultado, foram selecionadas duas tiras (diluição 1:5000), uma de cada gel transferido para a membrana, bloqueadas novamente com PBST e caseína a 1% por 3 horas sob agitação a 4 a 8°C. As tiras foram lavadas por três vezes, durante 5 minutos com PBST sob agitação a 4 a 8°C, e incubadas com o anticorpo R14 (IgG de coelho imunizado com recLack) na concentração 1:5000 em PBST e caseína a 1%, *over night* sob agitação a 4 a 8°C. As tiras foram lavadas por três vezes, durante 5 minutos com PBST sob agitação a 4 a 8°C. As tiras foram incubadas com Proteína A peroxidase na concentração 1:5000 em PBST e caseína a 1% e durante 2 horas sob agitação a 4 a 8°C. Após lavar três vezes, durante 5 minutos com PBST sob agitação a 4 a 8°C. A revelação foi realizada com DAB (3,3 diaminobenzidina (DAB), peróxido de hidrogênio a 30 %, tampão citrato fosfato), até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com água destilada.

5.6.2 Western Blot da proteína recLack ante IgY de avestruz anti-recLack

Utilizando quatro tiras da membrana já preparada de acordo com o item 5.6.1 a IgY obtida (M4) foi diluído 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000 em solução de PBST com caseína 1%, incubando as tiras durante 3 horas sob agitação de 4 a 8°C. Após lavar três vezes, durante cinco minutos com PBST sob agitação a 4 a 8°C foram incubadas com o conjugado na concentração 1:2000 (IgG de coelho anti-IgY de galinha marcado com peroxidase - PROMEGA[®]) *over night* sob agitação a 4 a 8°C. Após lavar três vezes, durante 5 minutos com PBST sob agitação a 4 a 8°C. foi adicionada Proteína A peroxidase na diluição 1:5000 em solução de PBST com caseína 1% durante 2 horas sob agitação a 4 a 8°C. A revelação foi realizada com DAB (3,3 diaminobenzidina (DAB), peróxido de hidrogênio a 30 %, tampão citrato fosfato), até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com água destilada.

6. RESULTADOS

6.1 Purificação de anticorpos IgY de gemas de ovos da avestruz e quantificação das proteínas.

A extração das proteínas das duas gemas dos ovos congeladas foi realizada utilizando Sulfato de Amônio ou Sulfato de Sódio para avaliar a qualidade da extração. As amostras dos dois ovos foram purificadas com Sulfato de Amônio (M1- 0,06g/mL e M2 - 0,07g/mL) e Sulfato de Sódio (M3 - 0,07g/mL e M4 - 0,08g/mL). As concentrações foram obtidas pelo método do Ácido Bicinconínico.

6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi realizado com a recLack, com as amostras M1, M2, M3 e M4 e com marcador de peso molecular como demonstrado na figura 6. A coluna em que a recLack foi aplicada demonstra somente sua presença, não apresentando outras substâncias. O perfil eletroforético da IgY da fêmea ocorreu após inoculação com proteína recombinante recLack (3 - M1, 4 - M2, 5 - M3, 6 - M4).

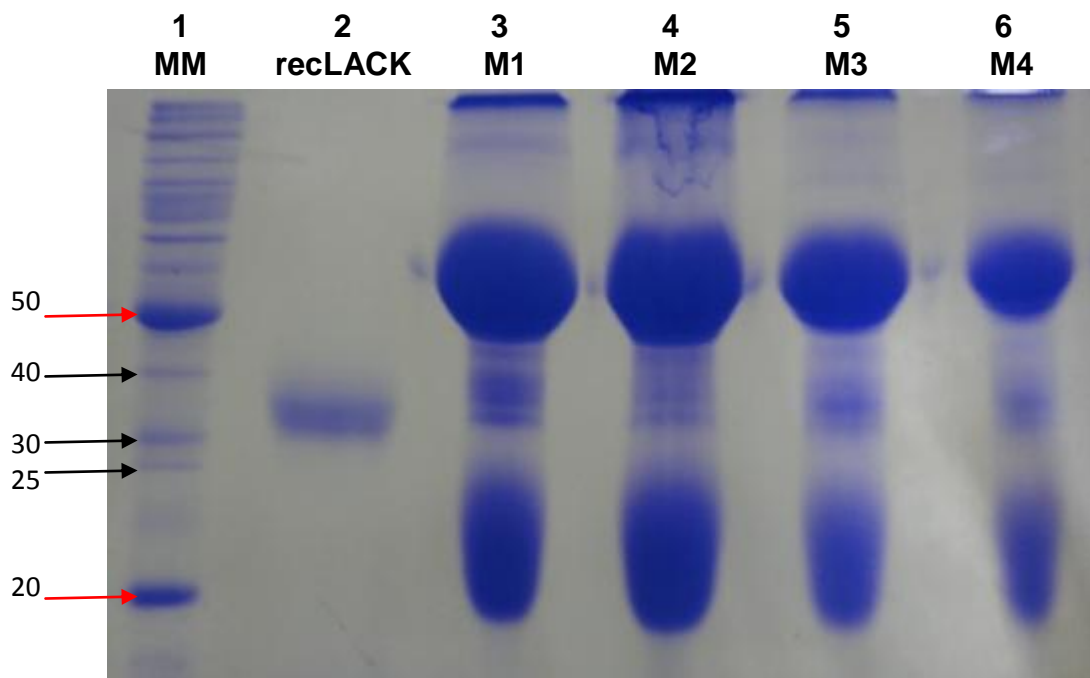


Figura 6 – Gel de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. 1- Marcador de peso molecular (MM); 2- recLACK; 3- M1; 4- M2; 5- M3; 6- M4. As setas vermelhas indicam as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas, respectivamente.

6.3 Padronização do ELISA utilizando recLack

Na padronização pela técnica de ELISA a concentração ideal da recLack foi $5\mu\text{g/mL}$, a do conjugado (anticorpo secundário IgG de coelho anti-cão SIGMA[®]) foi 1:40.000 e a concentração de caseína foi 3%.

6.4 ELISA utilizando a IgY de avestruz anti-recLack ante recLack e Extrato Total de *L. (L.) infantum chagasi*

O material extraído M4 (IgY) utilizado no método de ELISA não apresentou reação significativa no reconhecimento do extrato bruto de *Leishmania chagasi* quando comparado com a da recLack.

6.5 ELISA utilizando os antígenos recLack e Extrato Bruto Total de *L. (L.) infantum chagasi* ante soros infectados e não infectados para LVC

Dos 72 soros infectados utilizados ante recLack, sete (9,72%) apresentaram reação e dos 72 soros não infectados utilizados, nove (12,5%) apresentaram reação.

6.6 Titulação por ELISA de IgY extraída das gemas dos ovos e de amostras de soros de avestruz ante recLack utilizando IgG anti-IgY de coelho e cabra biotinilados

Os gráficos abaixo relacionados (figura 7, 8, 9 e 10) demonstram que houve um aumento da titulação de anticorpos no soro e gemas da ave após a série de imunizações com a recLack identificado com os dois reagentes produzidos em cabra e coelho.

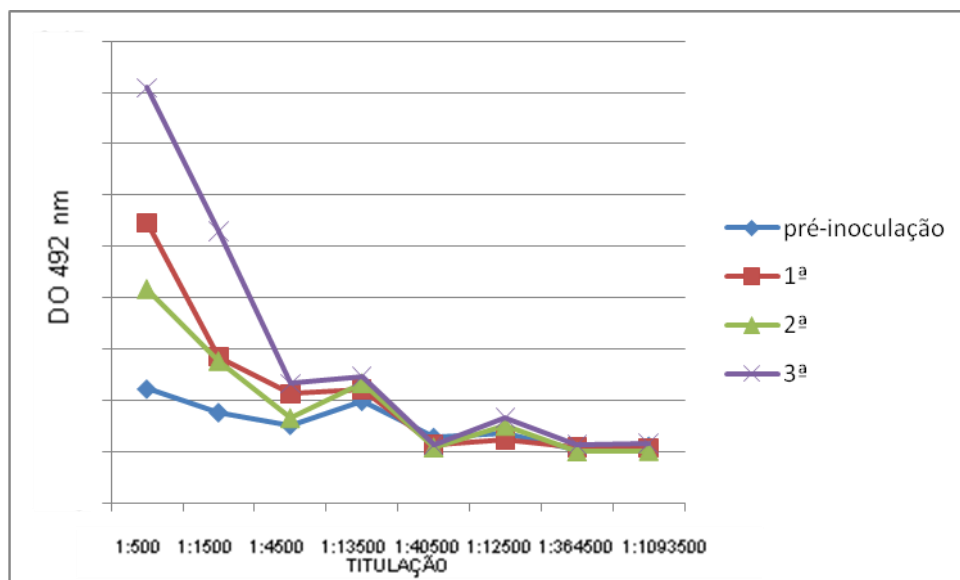


Figura 7 – Titulação de anticorpo IgY anti-recLack utilizando anticorpo de coelho anti-IgY. Titulação dos soros da avestruz imunizada com recLack colhidos na pré-imunização e na 1ª (linha azul), 2ª (linha vermelha), 3ª (linha roxa) inoculações.

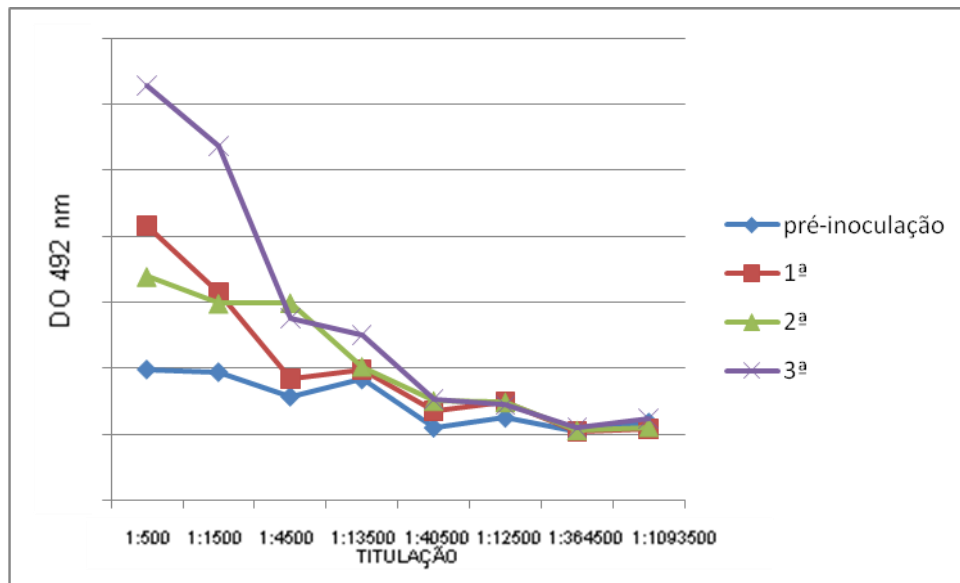


Figura 8 - Titulação de anticorpo IgY anti-recLack utilizando anticorpo de cabra anti-IgY. Titulação dos soros da avestruz imunizada com recLack colhidos na pré-imunização e na 1ª (linha azul), 2ª (linha vermelha), 3ª (linha roxa) inoculações.

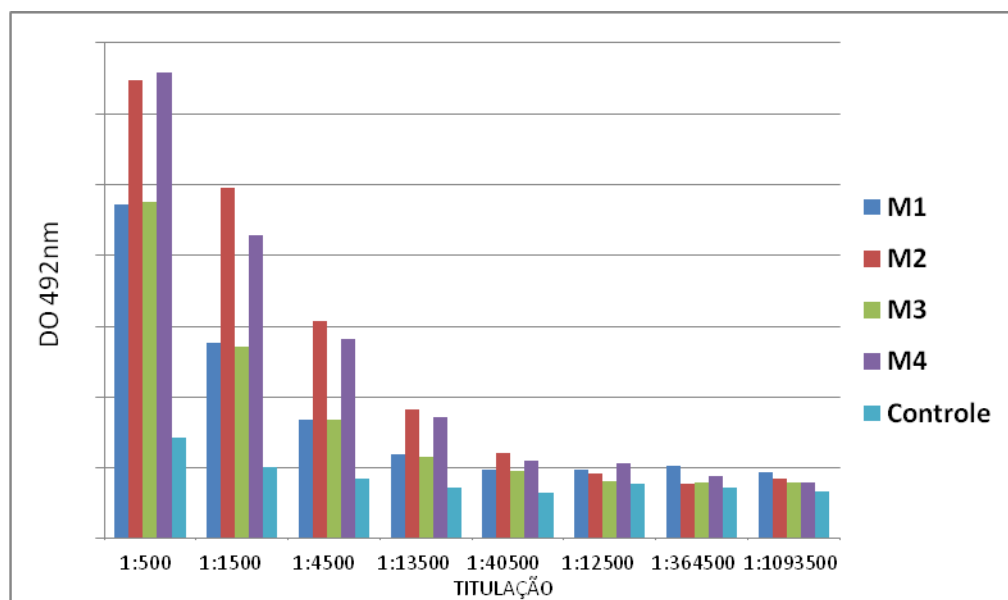


Figura 9: Titulação de anticorpos de coelho anti-IgY de avestruz ante o material extraído da gema de ovos, pelos métodos de sulfato de amônio e sulfato de sódio.

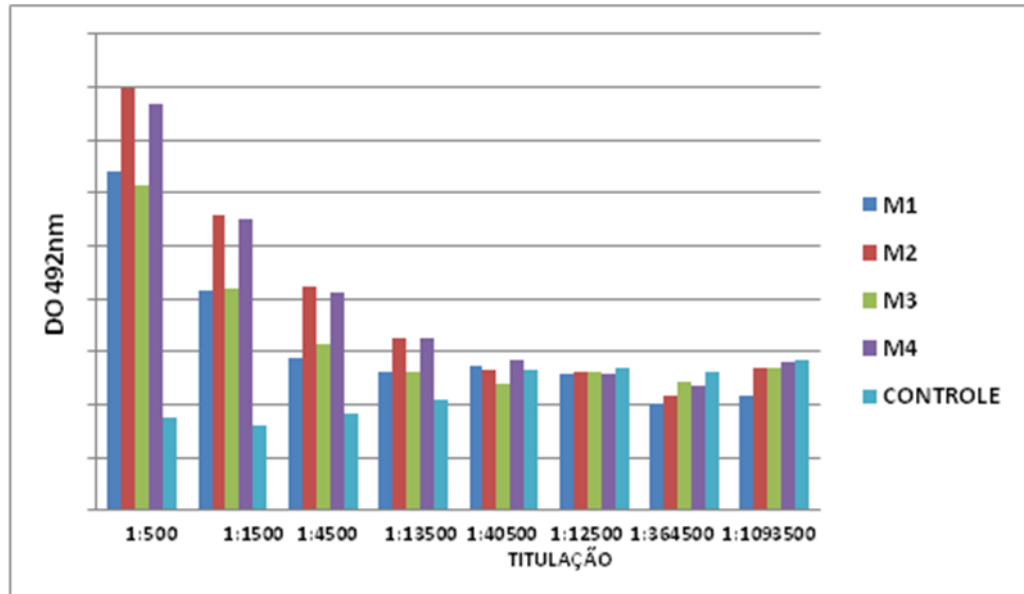


Figura 10: Titulação de anticorpos de cabra anti-IgY de avestruz ante o material extraído da gema de ovos, pelos métodos de sulfato de amônio e sulfato de sódio.

6.7 Western Blot

A proteína reLack ante o soro de cão positivo não teve reação significativa (figura 11). Na figura 12 demonstra-se a presença da proteína reLack nas membranas testadas.

Na figura 13 mostra-se que a IgY obtida (M4) reconheceu de forma significativa a reLack nas diferentes concentrações.

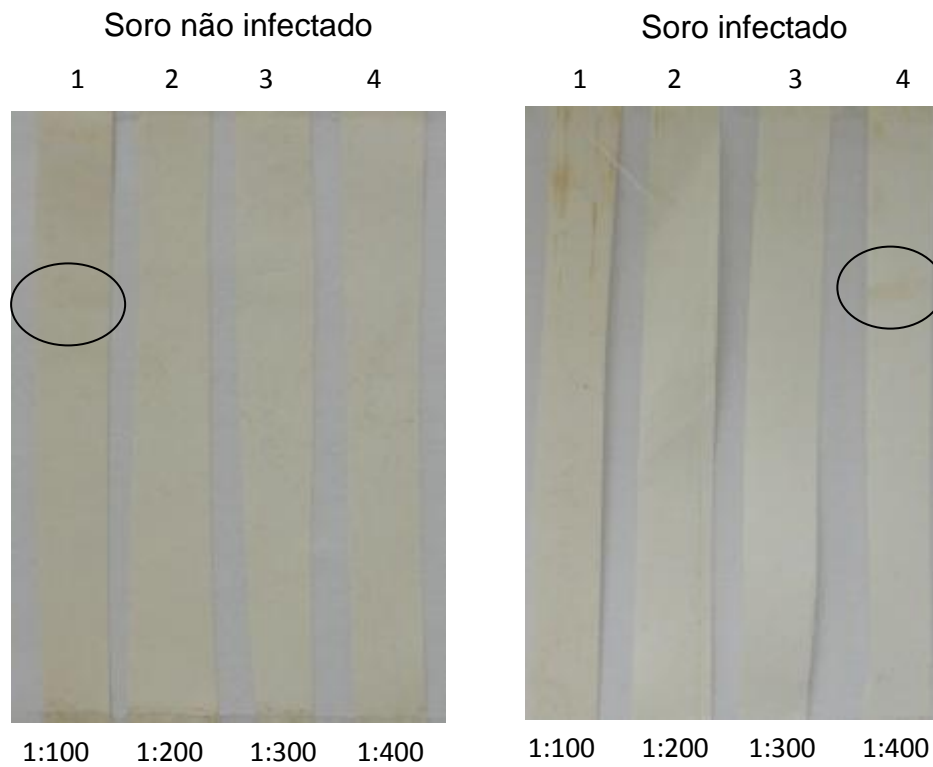


Figura 11 – Western Blot da proteína recLack ante soros infectados e não infectados em concentrações 1:100, 1:200, 1:300, 1:400. A membrana do soro infectado com diluição 1:400 e a membrana do soro não infectado com diluição 1:100 tiveram uma leve reação.



Figura 12 – As membranas da diluição 1:500 dos soros infectados e não infectados foram bloqueadas novamente e submetidas ao soro controle R14 (IgG de coelho imunizado com recLack).

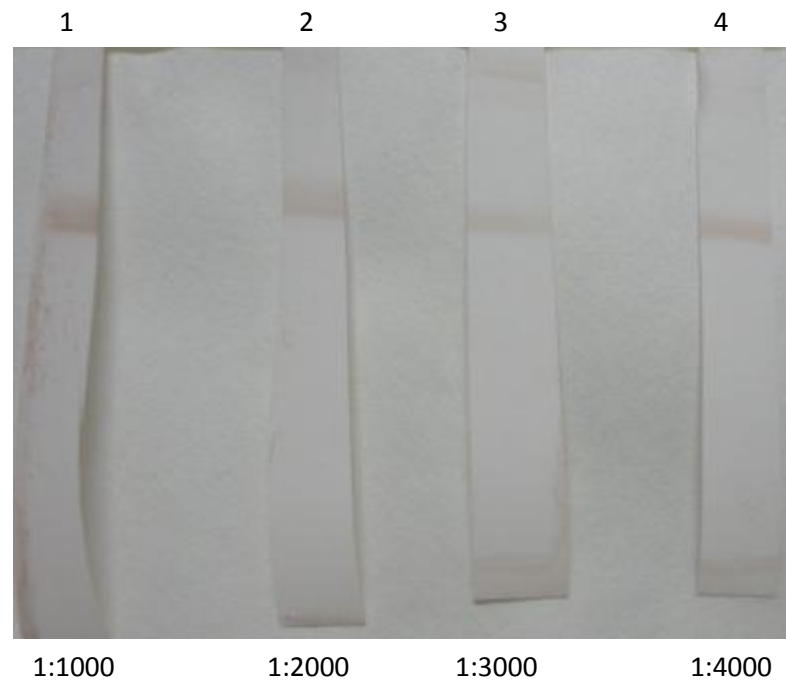


Figura 13 – Western blot da proteína recLack ante IgY de avestruz anti-recLack nas diluições 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo descritivo foi desenvolvido anticorpo policlonal IgY anti proteína recombinante (reLack) utilizando avestruz como modelo animal para fins de testes diagnósticos. A metodologia empregada para análise da especificidade dos anticorpos IgY ante reLack e extrato bruto demonstrou ampla variação de resultados.

Os anticorpos produzidos forma originários de gema dos ovos da ave hiperimunizada com proteína recombinante reLack. Em relação aos métodos de extração, os resultados obtidos com sulfato de amônia a 20% e sulfato de sódio a 19% mostraram-se eficientes. As concentrações de IgY extraídas, por ambos os métodos, variaram entre 0,06g/mL e 0,08g/mL. Em galinhas são mencionadas concentrações de IgY a partir de ovo que variam de 0,01 a 0,02g/mL, podendo-se encontrar de 1 a 4g/mL. Tal variação está 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). O produto final obtido (IgY purificada) pela extração com sulfato de sódio foi superior em qualidade, quando comparado ao obtido por outros autores, embora tenham utilizado menor concentração de sulfato de sódio (8,8%) em ovo de galinha (HODEK *et al.*, 2013). Em relação ao rendimento por ovo, deve-se salientar que um ovo de avestruz pesa em média de 1,3 Kg a 1,5Kg e contém em torno de 300mL de gema (TOBIAS, 2011) e em condições favoráveis uma fêmea põe em média de 30 a 40 ovos por ano, concentrados no período reprodutivo (de julho-agosto a dezembro-janeiro no Brasil). Nesta ocasião a fêmea, no pico de postura, irá produzir um ovo a cada 2 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. (KORNFELD *et al.*, 2004). Assim podemos concluir que a produção de anticorpo policlonal em gema de ovo de avestruz possui um bom rendimento de acordo com Tobias (2011) e este valor pode chegar a 66g de IgY por estação de postura.

Em relação ao esquema de imunização utilizado no presente trabalho, outros autores relatam que a inoculação pode ser feita via intra-muscular na região lombar das aves administrando de 30 a 50µg/ave de hemaglutinina (HA) do vírus H5N1 emulsificada em Adjuvante Completo de Freund (ADACHI *et al.*, 2008). Estes

autores sugerem que a dose administrada foi suficiente para alcançar altos títulos contra HA no soro e na gema das aves. No presente estudo, o esquema de imunização da avestruz com proteína recombinante recLack (200 mg por imunização) em intervalos de 21 dias, foi capaz de induzir uma resposta imune compatível com níveis de anticorpos nas amostras de soros (Figuras 7 e 8), diferentemente de Adachi *et al.* (2008) que utilizaram intervalos de 2 semanas. Estes resultados, juntamente com o de Tobias (2011) demonstram que concentrações de IgY são transferidas para as gemas em níveis consideráveis, mesmo após intervalos maiores entre as imunizações, diminuindo o nível de estresse dos animais imunizados e, conseqüentemente, com melhora no manejo e resposta ao estímulo antigênico.

A titulação de anticorpos presentes na gema dos ovos aumentou à medida que as imunizações foram realizadas. Na última etapa de imunização as titulações alcançaram títulos detectáveis utilizando anticorpos tanto de cabra quanto de coelho (Figuras 9 e 10). Este resultado é esperado, de acordo com a literatura (LARSSON *et al.*, 1993) cujos autores observaram que a concentração de IgY na gema é mais alta que no soro das aves.

De acordo com Tobias (2011) os resultados obtidos na produção dos conjugados anti-avestruz marcados com biotina, em cabra e coelhos, as IgY de avestruzes apresentaram maior avidéz com soros de avestruz e ema e, em menor grau com as outras espécies testadas, inclusive ante soro de galinha. Neste sentido, o autor sugere o uso de imunoglobulinas específicas de avestruzes em testes para fins diagnósticos.

Entre as 72 amostras de soros de cães infectados para LV testados ante a proteína recLack, sete deles (9,72%) apresentaram positividade no teste de ELISA, quando comparados à dos antígenos contidos no Extrato Bruto, sugerindo que estes animais responderam de forma diferente aos demais indivíduos testados. Como os históricos clínicos desses animais não estava disponível tornou-se impossível tecer qualquer tipo de especulação para sabermos em que momento se deu a infecção. Uma possibilidade seria de que estes animais em algum momento da infecção foram capazes de destruir as células do protozoário e expor os antígenos, inclusive contra Lack, entre outros antígenos. Sabe-se que a Lack é uma proteína citoplasmática e não ligada à estrutura de membrana do protozoário (GONZALEZ-ASEGUINOZALA *et al.*, 1999). Segundo Todolí *et al.* (2010), apenas um cão resultou positivo ante o

teste de intradermorreação com a proteína rLACK, cujos resultados podem sugerir que a resposta imune mediada por células dos animais contra LACK do parasito não é comum em cães clinicamente saudáveis, naturalmente infectados por *L. infantum*. Nesta direção, esta proteína não induziria a linfoproliferação em pacientes curados de LV (MAASHO *et al.*, 2001). Pode ser ressaltado que a LACK está entre os antígenos que desempenham papel importante na patogênese da infecção por *Leishmania* em pacientes com apresentações clínicas diferentes (SUFFIA *et al.*, 2005).

Entre as amostras de 72 soros de cães não infectados para LV, nove deles (12,5%) apresentaram reação positiva ante a proteína recLack pelo teste de ELISA. Em ambos os casos, de soros de cães infectados e não infectados para LV, pode ser especulado que os anticorpos desses animais reconheceram antígenos bacterianos (*E. coli*) remanescentes nas amostras de recLack, embora todos os ensaios de pureza da referida proteína não tenham detectado este possível grau de contaminação das amostras utilizadas como imunógenos nas aves. De acordo com Todolí *et al.* (2010) que obtiveram diferentes proteínas recombinantes, entre elas rLACK, de *L. infantum*, produzidas em larvas de inseto (*Trichoplusia ni*) infectadas por baculovírus, consideraram a existência de reação cruzada com proteínas de inseto e mostraram que a rLACK é pouco reativa. No caso da presente pesquisa, a recLack foi desenvolvida em *E. coli* e, portanto, traços de antígenos bacterianos poderiam interferir nas reações pelo teste de ELISA, contudo, no ensaio de Western Blot a recLack mostrou perfil de alta pureza ante os anticorpos IgG de coelho e IgY de avestruz (figura 8).

Sabendo-se que a Lack é uma proteína que exhibe afinidade por complexos multiproteicos (Gonzalez-Aseguinozala *et al.*, 1999), neste trabalho os soros de cães não infectados para a doença reconheceram recLack, também desenvolveram anticorpos que reconheceram outros antígenos relacionados a outros patógenos. Neste sentido, a reação fracamente positiva observada no teste de Western Blot ante recLack testado contra IgG no soro de cão, aponta para um raciocínio semelhante ao observado no teste de ELISA, com a possível reação inespecífica contra outros antígenos, como por exemplo antígenos carboidratos possivelmente presentes na amostra recLack, provenientes de *E.coli*, que podem interferir no resultado. Esses antígenos carboidratos não são visualizados na eletroforese. (figura 9).

8. CONCLUSÃO

- O modelo animal utilizado para o desenvolvimento de anticorpos foi eficiente no reconhecimento do antígeno (recLack) na concentração utilizada, comprovado pelos testes de ELISA e Western Blot;

- O reagente recLack utilizado não apresentou compatibilidade para o diagnóstico de LVC, comprovado pelos testes de ELISA realizados com amostras padronizadas de soros de animais infectados e não infectados para LVC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.M. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta Med Port.** Oct,(10):871-5, 1998.

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.

ADAMS, J. & REVELL, B.J. Ostrich farming: a review and feasibility study of opportunities in the EU. School of Management, Harper Adams University College, Newport, Shropshire, UK. Internet web site: www.mluri.sari.ac.uk/mi361/feasibility/ostrich.htm, 1999.

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, M.A.; JESUS EE, SOUSA-ATTA ML. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol.** Feb;127(3-4):227-32, 2005.

ALMEIDA, M.C.; VILHENA V, BARRAL A, BARRAL-MELO M. Leishmanial infection: Analysis of first steps. **A review. Mem.Inst Oswaldo Cruz.** 98(7): 861-870, 2003.

ALVAR J, CAÑAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol.** ;57:1-88, 2004.

ALVES, A.S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F.B.; OLIVEIRA, R.V.C.; SCHUBACH, A.O.; MADEIRA, M.F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science** 93, 1329–1333, 2012.

AMARAL, J.A.; FRANCO M, T.; M. CARNEIRO-SAMPAIO, M.S.; CARBONARE, S.B. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. **Research in Veterinary Science**, England, v.72, n.,3, p. 229-234, 2002.

ANDRADE, T. A. S. Soroprevalência, fatores e aspectos clínicos associados à Leishmaniose Visceral Canina em Goiânia, Estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado. **Fundação Osvaldo Cruz**, Recife, 2014.

ANGEL, C. R. A review of ratite nutrition. **Animal Feed Science Technology**, v. 60, p. 241-246, 1996.

ANTON, M. Composition and structure of hen egg yolk. In: HUOPALAHTI, R.; FANDINO, R.L.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive egg compounds**. Berlin: Springer, p. 1-6, 2007.

ASSIS, T.S.M.; BRAGA, A.S.C.; PEDRAS, M.J.; BARRAL, A.M.P.; SIQUEIRA, I.C.; COSTA, C.H.N.; COSTA, D.L.; HOLANDA, T.A.; SOARES, V.Y.R.; BIÁ, M.; CALDAS, A.J.M.; ROMERO, G.A.S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 17(2):107-116, abr-jun, 2008.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.J. rk 39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**. N. 173, p. 758-761, 1996.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 3, p. 480-84, 1983.

BARBOSA, C.A.; CAMPELO, E.H.R.; PEREIRA, M.C.; MICHELS, I.L. Panorama da cadeia de estruoticultura no Brasil. **XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. Julho, 2007.

BARRAL-NETTO, M; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.24, n. 257, p. 545-548, 1992.

BATTISTI, L.O., Identificação do perfil plasmático e diferenciação das frações de proteínas plasmáticas em ratitas. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2009.

BERGHMAN, L.R.; ABI-GHANEM, D.; WAGHELE, S.D.; RICKE, S.C.; Antibodies: an alternative for antibiotics? **Poultry Science**. v. 84, n. 4, p. 660-666, 2005.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin Infect Dis**; 24:684-703, 1997.

BIZANOV, G.; JONAUSKIENE, I. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. v. 47, n. 1, p. 403-410, 2003.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, n. 28,p. 121-134, 1998.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). **Eur J. Epidemiol**. Mar;8(2):273-6, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: **Ministério da Saúde**, 122 p., 2003.

BRASIL; Portaria N°36, de 15 de março de 2002. Ministério do Meio Ambiente, Dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Diário Oficial da União** [da República Federativa do Brasil], Brasília, de 15 de março de 2002.

BRAY, R.S. Immunodiagnosis of leishmaniasis. In: Cahng KP, Bray RS. Leishmaniasis. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**; 1985.

BRAZ, R.F.S.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.A.; WILSON, M.E.; PEARSON, R.D.; EED, S.G.; JERONIMO, S.M.B. The Sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 67:344-348, 2002.

BRITO, M.E.F.; MENDONÇA, M.G.; GOMES, Y. *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p. 318-321, 2000.

BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 29-30, 1997.

BURNS, J.M.; SCHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARÓ, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a Kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 90:775-779, 1993.

CABRAL, M. O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 173-180, 1998.

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.

CAHIL, K.M. Field technique in the diagnosis of calazar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; 83:499, 1970.

CAMARGO, M.E. & REBONATO, C. Cross reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to Ensure Specific Results. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 18 :500-505, 1969.

CAMENISCH G.; TINI M.; CHILOV D.; KVIETIKOVA I.; SRINIVAS V.; CARO J.; SPIELMANN P.; WENGER R.H.; GASSMANN M., **The FASEB Journal**, 13,81-88, 1999.

CAMPBELL, R.D.; DODDS, A.W.; PORT, R.R. The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. **The Biochemical Journal**. v. 189, n. 1, p. 67-68, 1980.

CARLANDER, D. Avian IgY antibody. In vitro and in vivo. **Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala**. Dissertation from the Faculty of Medicine 1119, Uppsala, 53 pp., ISBN 91- 554-5227-2, 2002.

CARLANDER, D.; STALBERG, D.; LARSSON, A. Chicken antibodies. A Clinical Chemistry Perspective. **Uppsala Journal of Medical Sciences.**, v. 104, p. 179-190, 1999.

CARVALHO, F.A.; CHARESTE, H.; TAVARES, C.A.P.; MATLASHEWSKIF, G.; VALENTE, E.P.; RABELLO, A. *et al.* Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** Aug;43(4):289-95, 2002.

CARVALHO, M.L.R. Aspectos da imunidade celular em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, procedentes de área endêmica do Estado de Mato Grosso-Brasil, antes e após o tratamento com antimônio pentavalente. (Tese de Doutorado) **Instituto de Ciências Biológicas-Universidade Federal de Minas Gerais-Brasil**), p.157, 2000.

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. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires. v. 85, n. 2, p.179-189, 2004.

CHACANA, P. A; SCHADE R.; TERZOLO H.R. A new bacterial suitable for egg yolk immunoglobulin (IgY) large-scale chromatographic purification. **ALTEX**. v. 3, n. 5, p. 165, 2003.

CHEN, C.; TU, Y.; CHEN, T.; CHANG, H., J. **Agric Food Chem**, 50,5424-5428, 2002.

CHIARI, A.C.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A. Reação de imunofluorescência no controle do tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 15: 298-303, 1973.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CIPOLLA, A.; CORDEVIOLA, J.; TERZOLO, H. *et al.* *Campylobacter fetus* diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. **ALTEX**, v.18, n.3, p.165- 170, 2001.

CIRIACO, E.; PÍÑERA, P.P.; DÍAZ-ESNAL, B.; LAURÀ, R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and Bursa of Fabricius). **Microscopy Research and Technique**, United States. v. 62, n. 6, p. 482-487, 2003.

COSTA, M.B.C. Expressão e purificação de antígeno LACK recombinante de *Leishmania chagasi* em *Escherichia coli* e seu uso na produção de anticorpos policlonais. Monografia, UENF, 2002.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.

COUTINHO, S.G.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.C.A.; TRAMONTANO, N.A. Survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 80: 17-22, 1985.

CUBA-CUBA, C.A.; MERSDEN P.D.; BARRETO, A.C.; ROCHA, R.; SAMPAIO, R.R.; & PATZ-LAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de leishmaniasis tegumentaria americana. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, 89 :195-208, 1980.

CUNHA, A.M. & CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 32, p. 329-337, 1937.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, JR. G.; MOMEN, H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg**. 50: 296-311, 1994.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.V. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. May-Jun;48(3):151-6, 2006.

DAVIES, L.; SMITH, J.; BIRKETT, C.; MANSER, J.; ANDERSON, D.; YOUNG, J. Selection of a specific phage-display antibodies libraries derived from chicken immunoglobulin genes. **J. Immunol. Methods**. v. 186, p. 125–135, 1995.

DAVIS, C.; REEVES, R. High Value Opportunities From The Chicken Egg. Kingston: **Rural industries research and development corporation**, 61p., 2002.

DEANE, L.M., DEANE, M.P. Encontro de Leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. Ceará. **Hospital**, 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L.M. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. Rio de Janeiro, Tese. 162 pp, 1956.

DEEMING, D.C. Factors affecting hatchability during commercial incubation of ostrich (*Struthio camelus*) eggs. **Br. Poult. Sci.**, v.36, p.51-65, 1995.

DE PAULA, A. A.; DA SILVA, A.M. V., FERNANDES, O. *et al.* The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 832 – 836, 2003.

DRENOWATZ, C., SALES, J., SARASQUETA, D.V. & WEILBRENNER, A. History and geography. In: Drenowatz, C. (Ed.), *The Ratite Encyclopedia (Ostrich, Emu, Rhea)*, pp. 3}30. San Antonio, Texas, US: **Ratite Records**, Inc. 478 pp., 1995.

DUXBURY, R.E.; SADUN, E.H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 13:525-529, 1964.

EDANS, F.W.; THAXTON, P.; MORGAN, G.W.; PARKHURST, C.R. Grouping in Japanese quail 2. Suppression and humoral immunity. **Poultry science, United States**, v. 62, n. 12, p. 2479-2485, 1983.

ELAINE ROSE, M.; ORLEANS, E. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 5, p. 15-20, 1981.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saúde** 3(2):47-57, 2012.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 38-44, 2000.

FRAGA, D.B.M. *et al.* A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v.7 p.136, 2014.

FREITAS, J.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.; NETO, B.; SANTOS, G.; ABREU, C.; BRAGA, R. *et al.* Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Rev Soc Bras Med Trop.** 45(1):24-9, 2012.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 65:51-86, 1980.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F.J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 12, p. 617-623, 1996.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T. *et al.* Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB J**, v.4, n.5, p. 2528-2532, 1990.

GAZZINELLI, R.T.; HIENY, S.; WYNN, T.A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.1; n.90, p. 6115-6119, 1993.

GHETIE, V.; WARD, E.S. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. **Annu. Rev. Immunol.** 18, 739-766, 2000.

GIANNONI, M. L.. Avestruz, reprodução, cria e recria. **Manual CPT**. p.136. 2002.

GIGLI, I.; AUSTEN, K.F. Phylogeny and function of the human complement system. **Annual Review of Microbiology**, v.25, p.309-311, 1971.

GOMES YM, CAVALCANTI MP, LIRA RA, ABATH FG, ALVES LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet J.** Jan;175(1):45-52, 2008.

GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol.** 7(3):338-49, 2004.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; TADRIZ, S.; MARQUET, A.; LARRAGA, V. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **Eur. J. Biochem** 259: 909-916, 1999.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

GRIMALDI JUNIOR., G. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, n.1, p. 54-59, 2012.

GRIMALDI JUNIOR.,G., TESH, R.B. Leishmaniasis of the new world: Current conceptions and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, New York. v. 6, p. 230-250, 1993.

GRINDSTAFF, J. L.; BRODIE III E.D.; KETTERSON E. D. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 270, p. 2309-2319, 2003.

GUIMARÃES, F.N.; LAGE, H.A.; VENÂNCIO, I.A.& GRYNBERG, N.F. Estudo comparativo da reação indireta de anticorpos fluorescentes em Doença de Chagas, Leishmanioses Tegumentares e calazar com vários antígenos de *Leishmania* e *Trypanosoma*. **Hospital** (Rio de Janeiro), 75 : 299-313, 1969.

HARITH AE, KOLK AH, KAGER PA, LEEUWENBURG J, FABER FJ, MUIGAI R, *et al.* Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. Jul-Aug;81(4):603-6, 1987.

HASSL, A.; ASPOCK, H. Purification of egg yolk immunoglobulins A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *Journal of Immunological Methods* - **J IMMUNOL METHOD**; 110(2):225-228, 1988.

HEUFLER, C.; KOCH, F.; STANZL, U.; TOPAR, G.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; ENK, A.; STEINMAN, R.M.; ROMANI, N.; SCHULER, G. Interleukin- 12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by helper 1 cells. **European Journal of Immunology**, v.26, n. 3, p. 659-680, 1996.

HLINAK, A.; KRUGER, M.; BARTELS, T. *et al.* Studies on diagnostic applications of egg yolk antibodies against *Bordetella bronchiseptica*. **ALTEX**. v.13, n.5, p.70-72, 1996.

HO, M.; LEEUWENBURG, J.; MBUGUA, G.; WAMACHI, A.; VOLLER, A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 32:943-946, 1983.

HODEK, P.; TREFIL, P.; SIMUNEK, J.; HUDECEK, J.; STIBOROVA, M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. **Int. J. Electrochem. Sci**, 8, 113-124, 2013.

HOFFMAN, W.L.; RUGGLES, A.O.; TABARYA, D. Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positives results. **Journal of Immunological Methods**. v. 198, n. 1 p. 67-77, 1996.

HOFMAN, V.; BROUSSET, P.; MOUGNEAU, E.; MARTY, P.; LAMANT, L.; ANTOINE, J.C.; GLAICHENHAUS, N. & HOFMAN, P. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. **Am.J.Clin.Pathol.** 120: 567-574, 2003.

HOMMEL, M.; PEKIS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol.** 72: 213-218, 1978.

HUCHZERMEYER, F. W., Doenças de aves e outros ratitas 1. **Ed. Jaboticabal: Unesp**, 392 p., 2000.

HUOPALAHTI, R.; FANDINO, R.L.; ANTON, M.; SCHADE, R. Bioactive egg compounds. Berlin: **Springer**, 298 p., 2007.

INIESTA L, GÁLLEGO M, PORTÚS M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, 103: 77-81, 2005.

INIESTA, L.; BARREDO, S.F.; BULLE, B.; GÓMEZ, M.T.; PIARROUX, R.; GÁLLEGO, M.; ALUNDA, J.M.; PORTÚS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Barcelona, v. 9, n. 5, p. 1137-1141, 2002.

JARADAT, Z.W.; MARQUARDT, R.R. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. **Food and Agricultural immunology**, Unites States, v. 12, n. 4, p. 263-272, 2000.

JEFFEREY, J. Ostrich production. Extension Veterinarian, Texas Agricultural Extension Service, The Texas A&M University System. Internet web site: <http://gallus.tamu.edu/ratite/ostrich.html>, 1999.

JULIARENA, M.; GUTIERREZ, S.; CERIANI, C. Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.1, p. 43-51, 2007.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A., World's **Poultry Science Journal**, Vol. 60, Setembro, 2004.

KIM, H.; NAKAI, S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, United States, v. 63, p. 485-490, 1998.

KITAGUCHI, K.; OSADA, K.; HORIO, F.; MURAI, A. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulins Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 121, n.3-4, p. 290-299, 2008.

KLASING, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science, United States**, v. 77, p. 1119–1125, 1998.

KUNZ, U. S.; POSPISCHIL, A.; PACCAUD, M. F. Immunohistochemical detection of Chlamydiae in formalin-fixed tissue sections: comparison of a monoclonal antibody with yolk derived antibodies (IgY). **Zentralbl Veterinarmed B.**, v.38, n.4, p.292-298, 1991.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-5, 1970.

LAINSON, R & SHAW, J.J, - Evolution, classificacion and geographical distribution. In PETERS & KILLICK-DENDRICK. The Leishmaniasis in Biology and Medicine; London, **Academic Press**, 1, p. 1-20, 1987.

LARANGEIRA, D.F. Avaliação da imunidade imune-humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* sua correlação com a transmissibilidade para o vetor. **Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo**, 2009.

LARSSON, A.; BALOW, R.; LINDHAL, T.L.; FORSEBERG, P. Chickens antibodies: talking advantages of evolution – a review. **Poultry Science**, 72: 1807-1812, 1993.

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

LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJOQUIST, J. Use of chicken antibodies in Enzyme Immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, United States, v. 37, p. 411-414, 1991.

LEAL, C.R.B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. *Bepa* 6(69):14-18, 2009.

LEE, D. Y.; CHO, Y. W.; KANG, S. G. et al. Development of a novel antigen capture-ELISA using IgY against porcine interleukin-6 and its application. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.4, p. 337-343, 2004.

LEE, K. A.; CHANG, S.K.; LEE, Y.J.; LEE, J.H.; KOO, N.S. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 488-493, 2002.

LEMOS, E. M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic teste (Kalazar Detect TM) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, Basel, v.107,n. 1, p. 205-207, 2008.

LESLIE, G.A. & CLEM, L.W. Phylogeny of immunoglobulin struture and function. **Journal of experimental Medicine**, v. 130, p. 1337-1352, 1969.

LIMA, V.M.F. *et al.* Comparison between ELISA using total anigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. ¾, p. 330-333, 2010.

LIRA, R.A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: avaliação de desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina- Bio-Manguinhos. Dissertação. Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, **Departamento de Saúde Coletiva**, 2005.

LONGSTAFFE, J.A.; GUY, M.W. Canine leishmaniasis, United Kingdom update. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, n. 10, p. 663-671, 1996.

LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F. et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human, health hazard. **J. Small Anim. Pract.**, v. 24, n. 1, p. 29-30, 1983.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGHT, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein mensurament with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 193: 265-275, 1951.

MAASHO K , WOLDAY D , EDJIGU M , SODERSTROM K , BRITTON S, AKUFFO H. Induction and abrogation of LACK reactive cells in the evolution of human leishmaniasis . **Clin Exp Immunol** 124: 255 – 261, 2001.

MACLAREN, R.D.; PROSSER, C.G.; GRIEVE, R.C.J. The use of caprylic acid for extraction of immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunized with ovine α -lactalbumin. **Journal of immunological Methods**, Netherlands, v. 177, n. 1, p. 175-184, 1994.

MADEIRA, M.F., SCHUBACH, A.O., SCHUBACH, T.M., PEREIRA, S.A., FIGUEIREDO, F.B., BAPTISTA, C., LEAL, C.A., MELO, C.X., CONFORT, E.M., MARZOCHI, M.C. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for Leishmania from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology** 138, 366–370, 2006.

MAIA, C. Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol. Dec**;158(4):274-87, 2008.

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.

MARZOCHI, M.C.A. Curso - Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.63, n.5/6, p.82-104, 1992.

MARZOCHI, M.C.A.; SABROSA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.F.; TRAMONTANO, N.C.; RANGEL-FILHO, F.B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 1. p. 5-17, 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C. & SOUZA, W. J. S. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 22:149-155, 1980.

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.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G.A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol. Biochem. Parasitol.** 59: 327-329, 1993.

MENDONÇA, S.C.F.; SOUSA, W.J.S.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, 83: 347-355, 1988.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J Clin. Microbiol.** Nov;43(11):5515-9, 2005.

MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. **Food and Agricultural Immunology**, United States, v. 13, n. 1, p. 275-288, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV, Brasília – DF, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – SINAN - Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. **Ed. Ministério da Saúde**. 122p, 2006.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **R. Soc Trop Med Hyg.** Jul-Ag;88(4):491-3, 1994.

MONTENEGRO J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilis** 13:187-184, 1926.

MORRIS, C.A., HARRIS, S.D., MAY, S.G., HALE, D.S., JACKSON, T.C., LUCIN, L.M., MILLER, R.K., KEETON, J.T., ACUFF, G.R. & SAVELL, J.W. Ostrich slaughter and fabrication: 2. Carcass weights, fabrication yields, and muscle color evaluation. **Poultry Science**, 74: 1688-1692, 1995.

MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.N.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frango de corte. São Paulo. **Funep, Fapesp**, p. 231-235, 2002.

MORRISON, S.L.; MOHAMMED, S.M.; WIMS, L.A.; TRINH, R.; ETCHES, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, England, v. 38, p. 619-625, 2001.

MOTOI, Y.; INOUE, S.; HATTA, H. et al. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. **J. Infect.Dis.**, v.58, n.2, p. 115-118, 2005.

MOUGNEAU, E; ALTARE, F.; WAKIL, A.; ZHENG, S.; COPPOLA, T.; WANG, Z.E.; WALDMANN, R.; LOCKSLEY, R.M.; GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. **Science** 268: 563-566, 1995.

NARABARA, K.; ABE, A.; GERILECHAOGETU; HANIEH, H.; KONDO, Y. B cell differentiation in the Bursa of Fabricius and spleen of embryos and chicks immediately after hatching. **Animal Science Journal**. v. 80, p. 669–677, 2009.

NARAT, M. Production of antibodies in chickens. **Food Technol. Biotechnol.**; v. 41, n. 3, p. 259-267, 2003.

NTAKARUTIMANA, V.; DEMEDTS, P.; SANDE, M. et al A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferring from egg yolk. **Journal of Immunological Methods**, v.153, n.1-2, p.133-140, 1992.

ODDO, F.G. & CASCIO, G. Ill test di immunofluorescenz nella leishmaniosi viscerale e cutânea. **Ver. Inst. Sieroter. Ital.**, 38 : 139-145, 1963.

OKUNO, T.; TAKEUCHI, M.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. & MATSUMOTO, Y. Pretreatment of Leishmania homologues of receptors for activated C kinase (LACK) promotes disease progression caused by *Leishmania amazonensis*. **Exp. Anim.** 51(4) 335-341, 2002.

OLIVEIRA, 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.

OPS/OMS, Consultas de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, Brasília, Brasil, 23 a 25 de novembro de 2005.

ORDEIX, L. et al. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. Infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. *Veterinary Dermatology*, v. 16, p. 187-191, 2005.

PAYNE, T. Ostrich production will return to South Africa. Internet web site: www.woza.co.za/comps/teique70.htm, 1998.

PEDRAS, M.J.; VIANA, L.G.; OLIVEIRA, E.J.de; RABELLO, A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 102: 172-178, 2008.

PICHLER, H.; KRŠKA, R.; SZEKACS, A.; et al. An enzyme-immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by use of yolk antibodies. **Fresenius J. Analyt. Chem.**, v.362, n.1, p.176-177, 1998.

PINELLI E, KILLICK-KENDRICK R, WAGENAAR, J, BERNARDINA W. DEL REAL, G., RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, 62: 229-235, 1994.

PLESSIS, D. H. D.; WYNGAARDT, W. V.; ROMITO, M.; et al. The use of chicken IgY in a double antibody sandwich ELISA for detecting African horsesickness virus. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, v.66, n.1, p. 25-28, 1999.

POLSON, A.; WECHMAR von, M.B.; REGENMORTEL van, M.H.V. Isolation of viral IgY antibodies from eggs yolks of immunized hens. **Immunology Communications**, v. 9, p. 475-493, 1980.

PORROZZI, R.; COSTA, M.V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.; SANTOS C.D. *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vacc Immunol.** May;14(5):544-8, 2007.

QUEIROZ, N. M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKE-BUZETTI, W.A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de Imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v.19, p.34-40, jan.-mar., 2010.

RATCLIFFE, M.J. Antibodies, immunoglobulin genes and the Bursa of Fabricius in chicken B cell development. **Development and Comparative Immunology**, v. 30, p. 101-118, 2006

REBÊLO, J.M.M.; MENDES, W.A.; COSTA, J.M.L.; CAVALEIRO, N. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do Estado do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública.* 12, p. 545-549, 1996.

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

REYNAUD, C.A.; BERTOCCHI, B.; DAHAN, A.; WEILL, J.C. Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. **Advances in Immunology**, v. 57, p. 353-379, 1994.

REZAI, H.R.; ARDEHALI, S.M.; AMICHAKIMI, G.; KHARAZMI, A. Immunological features of kala-azar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 27:1079-1083, 1978.

RIBEIRO, A.M.L., PINHEIRO, C.C. & SILVA, I.M. Uso de gema de ovo de galinhas hiperimunizadas para vacinação de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae.** 35(Supl.), p. 131 a 137, 2007.

RIBEIRO, F.C.; DE O SCHUBACH A.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, T.M.; MADEIRA, F.M., MARZOCHI, M.C. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Vet Parasitol.**148(3-4): 200-206, 2006.

RODRIGUES, E.H.G., Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, **Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/MS**, Recife, 2000.

RODRÍGUEZ-CORTÉS A, OJEDA A, LÓPEZ-FUERTES L, TIMÓN M, ATLET L, SOLANO-GALLEGO L, SÁNCHEZ-ROBERT E, FRANCINO O, ALBEROLA J.A long experimental study of canine visceral leishmaniasis. **Int J Parasitol.** 2007.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Apr;100(2):197-203, 2005.

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.

SALES, J. Ostrich feathers. In: Drenowatz C. (Ed.), *The Ratite Encyclopedia (Ostrich, Emu, Rhea)*, pp. 173}182. San Antonio, Texas, US: **Ratite Records**, Inc. 478 pp., 1995.

SALFELDER, A. & MANNWEILER, E. Immundiagnostische befunde an seren von Leishmaniose, Chagas, Malaria und Amöbiasis Patjenten in Endemiegebieten Venezuelas. **Tropenmed. Parasit.** 32 :194-196, 1981.

SANTOS, S.O.; et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology.** 12, p. 315-317, 1998.

SCALONE, A.; LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTI, G.; VESCO, G. *et al.* Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet Parasitol.** Apr;104(4)275-85,2002.

SCHADE R & CHACANA PA. Egg yolk compounds - Livetin fractions. pp. 25-32. En: Bioactive Egg Compounds. R. Huopalahti, Lopez-Fandiño R, Antón M, Schade R (Eds.). **Springer**, Germany, 2007.

SCHIMIZU, M., NAGASHIMA, H., SANO, K., HASHIMOTO, K., OZEKI, M. *et al.* Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(2): 270-274, 1992.

SCHNIERING, A.; SCHADE, R.; HIEPE, T. Development of an IgY-based assay for the detection of *Ascaris suum* antigens. **ALTEX**, v.13, suppl.1, p.62-65, 1996.

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity of Different Methods for the Extraction and Purification of IgY. **ALTEX**. v.13, n. 5, p. 35-39, 1996.

SENGUPTA PC. Immunodiagnosis of Kala-zar. Transactions of the Royal **Society of Tropical Medicine and Hygiene**; 63:46, 1969.

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. **ATLA** 33, 1–26, 2005.

SHAW, J.J. A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the sloth *Choloepus hoffmanni* in Panama. **Nature Lond** 201: 417- 418, 1964.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the satate of Bahia, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SHIMIZU, M., NAGASHIMA, H., HASHIMTO, K. & SUSUKI, T. Egg yolk antibody(IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations, **Journal of Food Science**, 59, 763–765, 1994.

SIEGEL, H.S. Adrenals, stress, and the environment. **World's Poultry Science Journal**, England, v. 27, p. 237-349, 1971.

SILVA, D.A., MADEIRA, M.F., TEIXEIRA, A.C., SOUZA, C.M., FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology** 179, 257–261, 2011.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **R. Trop. Ci. Agr. Biol.** 1(1):20-31, 2007.

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

SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; SILVA ROBERTO, A.C.B.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A.N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.32 n.4 Uberaba July/Aug., 1999.

SINHA, S., KUMAR, A.; SUNDARAM, S. A comprehensive analysis of LACK (Leishmania homologue of receptors for activated C kinase) in the context of Visceral Leishmaniasis. www.bioinformation.net, v. 9(16), 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and Immunoistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*- infected Dogs. **Journal Comparative of Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOUZA, J. D. S. Criação de Avestruz. Viçosa. **Aprenda Fácil Edit.**, 211p., 2004.

SOUZA, J.D.S., FERREIRA, W.M., AICHINGER, A., Aspectos estratégicos da nutrição e alimentação de avestruzes, Revisão Bibliográfica, **Revista Eletrônica Nutritime**, v.3, nº5, p.361-367 setembro/outubro, 2006.

STAAK, C.; SCHWARZKOPF, C.; BEHN, I.; HOMMEL, U.; HLINAK, A.; SCHADE, R.; ERHARD, M. Isolation of IgY from egg yolk. In: Schade, R.; BEHN, I. ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. Chicken egg yolk antibodies, production and application technology. Berlin: **Springer**, p. 65-107, 2001.

STAAK, C. Egg yolk antibodies (IgY) in routine diagnostic work. **ALTEX**, v.13, n.5, p.73-75,1996.

SUFFIA I , FERRUA B , STIEN X , MOGRABI B , MARTY P , ROUSSEAU D , FRAGAKI K , KUBAR J. A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis . **Infect Immun** 68: 630 – 636, 2000.

SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. Rapid Communications in Mass Spectrometry: **RCM**. v. 15, p. 708-712, 2001.

TALMI-FRANK D, STRAUSS-AYALI D, JAFFE CL, BANETH G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western Blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol.** 13(2):271-6, 2006.

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.

TIZARD, IR. (Ed). *Imunologia Veterinária. Uma Introdução.* 6.ed. São Paulo: **Roca**, 2002.

TOBIAS, F.L., Produção de imunorreagente IgY de avestruz (*Struthio camelus*) imunizados com proteínas recombinantes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, 2011.

TOBIAS, F.L.; GARCIA, L.N.N.; KANASHIRO, M.M.; MEDINA-ACOSTA, E.; BROM-DE-LUNA, J.G.; ALMEIDA, C.M.C.; AZEVEDO JÚNIOR, R.R.; LEMOS, M.; VIEIRAS MOTA, O. Growth inhibition of *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* strains by neutralizing igy antibodies from ostrich egg yolk. **Brazilian Journal of Microbiology.** ISSN 1517-8382, 2012.

TODOLÍ, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; JUAN, R.; MORELL, P.; NÚÑEZ, M.C.; LASA, R.; GÓMEZ-SEBASTIÁN, S.; ESCRIBANO, J.M.; ALBEROLA, J.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. Humoral and *In Vivo* Cellular Immunity against the Raw Insect-Derived Recombinant *Leishmania infantum* Antigens KMP11, TRYP, LACK, and papLe22 in Dogs from an Endemic Area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 83(6), pp. 1287–1294, 2010.

TRINCHIERI, G., Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunology Today**, v.14, n.7, p. 335-338, 1993.

TUCKWELL, C. The ostrich industry: the new rural industries, a handbook for farmers and investors. Internet web site: www.rirdc.gov.au/pub/handbook/ostrich.html, 1999.

VELARDE, D. T.; COSTA, I. M.; MOREIRA, J. S.; et al. Tecnologia IgY aplicada a produção do antiveneno botrópico. In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, II Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa e I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagens, 2007, Campos do Jordão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, supl.1, p.7, 2007.

VEXENAT, A.C., SANTANA, J.M., TEIXEIRA, A.R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 38, 177–185, 1996.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A.N.N. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. **Theory and practice. Bull World Health Organ.** 53: 55-65, 1976.

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

WOOLLEY, J. A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods.** v.178, n.2, p.253-265, 1995.

WHO. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/index.html>. Acesso em junho de 2000 e novembro de 2012.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO. 201p. Report n^o.: 949, 2010.

WHO. *Leishmania/HIV* coinfection, south-western Europe 1990–1998. Geneva, 2000.

ZANINI, M.S.; VIANA, K.F.; REIS, A.B. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology.** v. 173 p.143-146, 2010.

ZHANG, W.W., The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug 45 Disc.* **Today**, v. 8, n. 8, 2003.

ZIJLSTRA, E.E.; DAIFALLA, N.S.; KAGER, P.A.; KHALIL, E.A.; EL-HASSAN, A.M.; REED, S.G.; GHALIB, H.W. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. **Clin Diagn Lab Immunol.** Sep;5(5):717-20, 1998.