

**UFRRJ**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**TESE**

**Biotecnologia IgY Aplicada ao Imunodiagnóstico  
da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina**

**Marli Sidoni**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,**  
**TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**BIOTECNOLOGIA IGY APLICADA AO IMUNODIAGNÓSTICO DA**  
**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA**

**MARLI SIDONI**

*Sob a Orientação da professora*  
**Maria das Graças Miranda Danelli**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2016

636.808969  
S569b  
T

Sidoni, Marli, 1962-  
Biotecnologia IgY aplicada ao imunodiagnóstico da  
infecção pelo vírus da imunodeficiência felina / Marli  
Sidoni. – 2016.  
60 f.: il.

Orientador: Maria das Graças Miranda Danelli.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e  
Inovação Agropecuária, 2016.  
Bibliografia: f. 48-60.

1. Vírus da imunodeficiência felina - Diagnóstico - Teses.  
2. Gatos - Doenças - Teses. 3. Teste imunoenzimático –  
Teses. 4. Imunoglobulinas - Teses. 5. Gema de ovo – Testes  
– Teses. 6. Biotecnologia – Teses. I. Danelli, Maria das  
Graças Miranda, 1962- II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência,  
Tecnologia e Inovação Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM**  
**AGROPECUÁRIA**

**MARLI SIDONI**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora** no Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 01/12/2016.

---

Maria das Graças Miranda Danelli. Dra. UFRRJ  
(Orientadora)

---

Carlos Mazur. Dr. UFRRJ

---

Jose Godinho da Silva Junior. Dr. UFRJ

---

Marcelo Alves Pinto. Dr. FIOCRUZ

---

Valmir Laurentino Silva. Dr. FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, a Deus, meu agradecimento eterno.

Agradeço em especial a minha mãe e meu irmão, por me apoiarem e por estarem ao meu lado durante a minha vida e me ensinarem a não desistir dos meus sonhos, o meu muito obrigada de coração;

Ao meu pai, o senhor sempre está presente em minha vida. Sua memória é exemplo de dignidade e perseverança. Agradeço por ter sido meu pai (em memória);

Ao Peixoto, por ter segurado na minha mão e me convencer da grandeza desta conquista. Sua ajuda foi imprescindível para a realização desse trabalho, muito obrigada;

A minha orientadora, Prof. Maria das Graças Miranda Danelli, por acreditar no trabalho que seria desenvolvido e por depositar sua confiança em mim ao longo da pesquisa, meu muito obrigada;

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, ao atual diretor Artur Roberto Couto e ao vice-diretor Marcos da Silva Freire, pelo apoio e possibilidade de desenvolver este trabalho de Tese nos Laboratórios da vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências, Tecnologia e Inovação em Agropecuária da UFRRJ, Prof. Mauro Antonio Homem Antunes, a vice Coordenadora Prof<sup>a</sup>. Lúcia Helena Cunha dos Anjos e a Renata Gomes, meu muito obrigada;

Ao Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária da UFRRJ, pelo grande auxílio na manutenção e tratamento das aves utilizadas neste trabalho;

Ao chefe do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LATED/Biomanguinhos), Edimilson Domingos da Silva pelo apoio a tantos trabalhos realizados e aos amigos do LATED, em especial à Cristina Shaik, muito obrigada pelo apoio e carinho, que recebi de todos vocês;

Ao Chefe do Laboratório de Macromoléculas (LAMAM/Biomanguinhos), Prof. Jose Godinho da Silva Junior (Prof. Godinho, carinhosamente, *God*) pelo apoio e carinho que me foram dados ao longo deste e outros trabalhos durante a minha formação profissional, muito obrigada;

Ao Marco Alberto Medeiros e a Gabriela Santos Esteves, atual chefe do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER/Biomanguinhos), pelo apoio e carinho que também me foram dados ao longo deste trabalho, muito obrigada;

Ao meu amigo Gerson Silva de Lima, agradeço pela sua amizade e pelo estímulo para iniciar esta jornada, meu muito obrigada;

Ao meu amigo Hilton Jorge do Nascimento, muito obrigado pelo ombro amigo, pela paciência e por sempre estar disposto a me ajudar. Obrigado por tudo!

Às minhas amigas do LAMAM e LATER, Patrícia Jurgilas, Luãna E. L. Vidal, Maria Luiza B. Azevedo, Mariana M.T. Garcia, muito obrigada pela preciosa ajuda;

À Fernanda Santos e a Paula, do Departamento de Ciências Biológicas na Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, que me acolheram carinhosamente;

Ao Marcelo Alves Pinto, Lilian Queiroz (ONG Oito Vidas) e Paulinho, por todos os momentos tão especiais que passamos nas coletas das amostras dos gatucho, muito obrigada;

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

A todos, meu muito Obrigada.

## DEDICATÓRIA

*Ao **Bruno**,  
fonte de toda força e vontade que carrego comigo ao despertar de cada manhã,  
seu amor é um presente que ganhei da vida e vou levá-lo comigo para sempre.  
Obrigada por ser meu filho.*

“Onde colardes vossa atenção, lá estareis;  
para aquilo que dirigis vossa atenção, aquilo sereis”.  
S. G.

## BIOGRAFIA

Marli Sidoni, filha de Natalino Sidoni e Fausta Giusti Sidoni, nascida em 02 de janeiro de 1962 na cidade de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, Brasil. cursou o segundo grau no Colégio Anchieta em Nova Friburgo, ingressando em janeiro de 1980 no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas na Fundação Técnico Educacional Souza Marques no Rio de Janeiro, e diplomou-se em dezembro de 1983. Durante a graduação iniciou o estágio no Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Em dezembro de 1986 foi contratada como servidora Pública no enquadramento funcional de Tecnologista em Saúde Pública. Em 1991 recebeu o prêmio de Jovem Cientista na IV Jornada Científica da Fundação Oswaldo Cruz, com o trabalho: “Análise das proteínas de envelope dos vírus da hepatite B: caracterização com anticorpos monoclonais”. Em 1994 foi aprovada no processo de seleção para o Mestrado no curso de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, orientada pelo Dr. Hermann Schatzmayer tendo defendido a dissertação intitulada “Avaliação de Métodos de Cultivo e Purificação do Vírus da Hepatite A”. Em 1996 orientou a Daniella Maria Lucchesi do Programa Rhae de Iniciação Científica, no desenvolvimento e produção de anti-soros e conjugados, no Instituto de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz. De 1998 a 2002 participou dos projetos: “Produção de insumos e kits de diagnóstico para detecção de anticorpos específicos contra o vírus da hepatite A anti-HAV IgM e anti-HAV IgG”, e do “Estudo epidemiológico, sorológico e molecular das hepatites de transmissão entérica A e E. Em 2002 participou como Membro da Banca examinadora do Concurso Público Fiocruz/Bio-Manguinhos para avaliação dos candidatos ao perfil para a Padronização e Avaliação de Ensaios de Imunodiagnósticos. Em 2004, iniciou como gerente dos projetos: “Finalização do Desenvolvimento da Metodologia de Western Blot para confirmação sorológica da Infecção pelo HIV-1”, e, “Desenvolvimento de insumos (conjugados) para Imunofenotipagem e quantificação de CD3/CD4/CD8/CD45 por citometria de fluxo, em amostras de indivíduos infectados pelo HIV”. Em 2005 iniciou o curso de Especialização em Gestão de Imunobiológicos na COPPE/UFRJ tendo apresentado a monografia “Abordagem inicial para Análise de Risco do projeto de Desenvolvimento de insumos para imunofenotipagem e quantificação de CD3/CD4/CD8/CD45 por citometria de fluxo, em amostras de indivíduos infectados pelo HIV”, sob orientação do Dr. Andre Rego Macieira. Em 2013 foi aprovada no processo de seleção para o Doutorado do curso de Pós-graduação de Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária (PPGCTIA), área de concentração em Patobiologia Animal da UFRRJ, sob a orientação da Prof. Maria das Graças Miranda Danelli.



## RESUMO

SIDONI, Marli. **Biotecnologia IgY aplicada ao imunodiagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina**. 2016. 60 f Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária), Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O objetivo deste trabalho foi aplicar a tecnologia IgY no desenvolvimento de um teste imunoenzimático, ELISA, para o diagnóstico do FIV, contribuindo no estabelecimento de um modelo de produção para um *kit* nacional na área de medicina veterinária. A primeira etapa do desenvolvimento deste trabalho consistiu na revisão da literatura dos documentos próprios para produtos de uso veterinário, destinados a diagnosticar doenças dos animais, disponibilizados na legislação vigente. A consulta aos documentos nacionais e internacionais potencializou o esclarecimento de parâmetros de desempenho ou critérios de validação de métodos, para o desenvolvimento deste novo produto, denominado ELISA r-p24 IgY. A segunda etapa consistiu no estabelecimento da produção, purificação e caracterização físico-química da proteína recombinante p24 do FIV. A preservação da atividade biológica foi demonstrada por Western Blot com a presença de uma banda peptídica de aproximadamente 25 kDa, referente à proteína r-p24. A terceira etapa deste trabalho, consistiu na obtenção de anticorpos IgY anti-IgG de gato, a partir da inoculação em galinhas poedeiras. A cinética foi acompanhada por ELISA demonstrando um aumento gradativo do título de anticorpos na gema a partir da segunda semana, com um aumento significativo no 2º mês, e mantendo-se elevado durante todo o período de cinco meses. As concentrações médias de proteínas na galinha 1 foi de 40,1 mg/mL a partir de uma gema e na galinha 2 foi de 32,2 mg/mL por gema, no período de 5 meses. A quarta etapa deste trabalho consistiu no emprego da tecnologia IgY para o desenvolvimento, padronização e a validação do teste de Elisa r-p24 IgY para o diagnóstico da infecção causada pelo FIV. Os resultados obtidos foram: a acurácia de 99%, a sensibilidade de 97,7%, a especificidade de 99,5%, e o índice kappa de 99,1%. Na quinta etapa deste trabalho realizou-se o estudo comparativo do ELISA r-p24 IgY frente ao ELISA r-p24 IgG, e foi demonstrado o desempenho superior no ELISA r-p24 IgY. A validação do ELISA r-p24 IgY mostrou características desejáveis para o uso comercial, tais como alta precisão e manutenção da reatividade por um período mínimo de 12 meses. Conclui-se que o procedimento elaborado foi eficiente e possibilitou o desenvolvimento de um teste para o diagnóstico do FIV. O domínio da Tecnologia IgY poderá contribuir com a pesquisa e o desenvolvimento de novos ensaios atendendo às normas e diretrizes nacionais e internacionais, tanto de bem-estar animal como de validação, impulsionando o desenvolvimento nacional de *kits* diagnósticos de interesse em saúde humana ou animal.

**Palavras chave:** IgY. ELISA. Vírus da imunodeficiência felina.

## ABSTRACT

SIDONI, Marli. **Applied biotechnology IgY to the feline immunodeficiency virus infection immunodiagnostic**. 2016. 60 p. Thesis (Doctorate Studies in Science, Technology and Innovation in Agriculture), Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

This work focused on deploying IgY technology into developing ELISA immunoenzymatic test to FIV diagnose, contributing to the establishment of a production model for a kit in the field of veterinary medicine. The first stage of this work consisted in analyzing the literature of the veterinary documents aimed to diagnose animal diseases, as stated in our current legislation. The access to both national and international optimized the enlightenment of developing parameters and method validation criteria for the development of this new product, named ELISA r-p24 IgY. The second stage consisted in establishing purification production and physicochemical characterization of the recombinant protein p24 of FIV. The biological activity maintenance was proved by way of Western Blot test with the banda presence of approximately 25 kDa, referring to the p24 protein. The third stage was to obtain IgY cat anti-IgG, derived from hens inoculation. The kinetics were monitored by ELISA and the outcome demonstrated that as of the second week, there was a gradual increase in antibody in the yolk, and remained high throughout the period of five months. Reference to the chicken 1, the average concentration was 40,1 mg/mL e for the chicken 2 was 32,2 mg/mL, throughout the period of 5 months. The fourth stage was the use of IgY technology to develop, standardize e validate the r-p24 IgY ELISA related to its use to diagnose the infection caused by FIV. The results were: 99% accuracy, 97.7% sensitivity, 99.5% specificity and 99.1% kappa index. In the fifth stage was carried out a comparative study between ELISA r-p24 IgY and ELISA r-p24 IgG, and it was demonstrated superior performance of the ELISA r-p24 IgY. The ELISA r-p24 IgY to have favorable characteristics from a commercial perspective, such as high precision and maintenance of reactivity for a minimum period of 12 months. Therefore, the above described procedure was efficient and enabled the development of a FIV test. The predominance of IgY technology may contribute to research and development of new tests, following both international regulation related to animal welfare and validation, thus boosting national development of diagnostic kits, for the benefit of human health or animal.

**Key words:** IgY. ELISA. Feline immunodeficiency virus.

## RESUMEN EXTENDIDO

SIDONI, Marli. **Biotecnología IgY aplicada al inmunodiagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia felina**. 2016. 60 h. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación en Agropecuaria). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação. Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, RJ, 2016.

### 1. Introducción

Los anticuerpos policlonales específicos pueden ser obtenidos en grandes cantidades de la yema del huevo de gallinas inmunizadas, denominados anticuerpos IgY. Aunque con funcionalidad semejante a los anticuerpos IgG de mamíferos, los anticuerpos IgY presentan ventajas para la producción de inmunobiológicos: (i) obtención sin estrese para el animal; (ii) menos número de animales utilizados en la producción; (iii) grandes concentraciones de anticuerpos por yema; (iv) ausencia de interferencia del factor reumatoide y de las proteínas del sistema de complemento de los mamíferos, y (v) interactúa solamente con los receptores Fc de gallina. Las inmunoglobulinas de mamíferos son obtenidas normalmente por medio del uso de animales de laboratorio, principalmente conejos, cobayas y ratones, pero también animales de medio y gran porte, como caballos, cabras, entre otros. El procedimiento de inoculación y colecta de sangre de estos animales causa el sufrimiento y el estrese, con la posibilidad de llevarlos a muerte. Por otro lado, se extrae la IgY de la yema del huevo de aves ponedoras y la utilización de la tecnología IgY está de acuerdo con los esfuerzos internacionales para reducir, refinar y sustituir animales de experimentos, contribuyendo a favor del bienestar animal.

El virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) ha sido blanco de muchos estudios, pues causa disturbios inmunológicos asociados a infecciones oportunistas y neoplásicas en gatos domésticos que pueden ser fatales. Además, se trata de una enfermedad de difícil diagnóstico clínico, una vez que el gato puede presentar una gran variedad de indicios clínicos inespecíficos, necesitando, de esta forma, métodos de diagnósticos específicos de laboratorio.

En Brasil, los elevados costos de los insumos y kits importados para diagnósticos de diversas enfermedades humanas y animales estimulan el desarrollo de pruebas con tecnología nacional. Entretanto, una guía o un protocolo práctico que normalice el desarrollo y la validación de pruebas de diagnóstico animal no está disponible. A veces se obtiene el esclarecimiento de párrafos poco precisos en las legislaciones o en orientaciones extranjeras. Así siendo, hay la necesidad de analizarse los documentos pertinentes de producción y validación de productos para diagnóstico para uso veterinario, tanto nacional como internacional, y establecer procedimientos para el desarrollo y fabricación de reactivos inmunológicos.

En este contexto, la aplicación de la tecnología IgY en el desarrollo de la prueba ELISA nacional para la detección de anticuerpos contra el VIF posibilitará el establecimiento de un modelo de producción para inmunobiológicos en el área de medicina veterinaria.

El objetivo de este trabajo es aplicar la tecnología IgY en el desarrollo de una prueba inmunoenzimática ELISA para el diagnóstico del VIF, para contribuir, así, en el establecimiento de un modelo de producción para un kit nacional en el área de medicina veterinaria; aplicar un modelo de procedimientos, describiendo todo el proceso desde la concepción de la idea de un nuevo producto, pasando por las etapas de desarrollo hasta la validación de un inmunodiagnóstico.; producir, aislar, purificar y caracterizar físico-química y biológicamente el antígeno recombinante r-p24 presente en la cápside del VIF; producir, aislar, purificar y caracterizar físico-químicamente la IgG de gato; producir, aislar, purificar y caracterizar físico-química y biológicamente la IgY específica para IgG de gato utilizando

aves ponedoras. Desarrollar y validar la prueba ELISA r-p24 IgY utilizando IgY anti-IgG de gato para el diagnóstico de la infección por el VIF. Comparar el desempeño de la ELISA r-p24 IgY con la ELISA r-p24 IgG que utiliza anti-IgG de gato producida en mamíferos para el diagnóstico del VIF.

## **2. Material y Métodos**

Este estudio fue desarrollado en cinco etapas:

En la primera etapa, fue realizado un levantamiento de informaciones de los órganos oficiales conteniendo las directrices para la validación de ensayos de laboratorios destinados al diagnóstico de enfermedades de animales.

En la segunda etapa, fue realizado el establecimiento de la producción, purificación y caracterización físico-química de la proteína recombinante p-24 del VIF expresada en E.coli. Después de la expresión, la proteína r-p24 fue purificada utilizando la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), y fueron realizados los estudios de caracterización físico-química y biológica de la proteína.

En la tercera etapa, fue realizada la obtención de las muestras de sangre de gatos de propietarios particulares y abrigos ubicados en la ciudad de Río de Janeiro. Fueron colectadas muestras de sangre de gatos adultos provenientes de propietarios particulares y abrigos ubicados en la región metropolitana de Río de Janeiro, sin distinción de raza o sexo, en el período entre noviembre de 2014 y abril de 2016. La IgG de gato fue purificada en columna de intercambio iónico Hitrap QFF 1mL, y fue realizada su caracterización físico-química.

En la cuarta etapa fue empleada la tecnología de IgY en el desarrollo, estandarización y validación de la prueba de ELISA r-p24 IgY para el diagnóstico del VIF. Se utilizaron dos gallinas de postura de líneas comerciales Hy-line en la obtención de la IgY, con 22 semanas de edad. Las inoculaciones fueron realizadas durante los días 0, 15, 30 y 66 con 500 µL de una emulsión conteniendo 250 µL de IgG de gato con adyuvante de Freund Completo e Incompleto. El inóculo fue administrado vía intramuscular en el músculo pectoral de las gallinas. El monitoreo de la producción de IgY fue evaluada por ELISA. La IgY precipitada en PEG fue purificada por cromatografía de afinidad tiofílica utilizando la columna HiTrap IgY 5mL, la homogeneidad de la preparación purificada de la IgY fue analizada por SDS-PAGE y la reactividad cruzada de la IgY fue analizada por Western Blot, utilizándose inmunoglobulinas IgG de mamíferos purificadas (IgG canina, de cobaya, de carnero, de conejo, de equino y de porcino). El desarrollo de la ELISA r-p24 fue iniciado con el preparo de las muestras de referencia a partir de sueros sabidamente negativos y positivos para VIF. La IgY anti-IgG de gato purificada fue conjugada a la peroxidasa, y la estandarización de la ELISA r-24 empleó la titulación cruzada para establecer las condiciones ideales de uso de los insumos que componen la prueba. La validación del kit de ELISA r-p24 IgY para diagnóstico del VIF fue basada en los 11 criterios de validación preconizados por la OIE y por el MAPA para el desarrollo y validación de productos de uso veterinario, destinados a diagnosticar enfermedades en los animales.

En la quinta etapa, fue utilizada la comparación de la prueba ELISA r-p24 IgY desarrollada en este estudio frente a la prueba ELISA r-p24 IgG que utiliza la anti-IgG de gato relacionada a la peroxidasa producida en mamíferos para el diagnóstico de la VIF.

## **3. Resultados**

En la primera etapa de este trabajo, después del levantamiento bibliográfico, fue definida la aplicación de los 11 criterios de validación de estudios diagnósticos de la OIE, a saber: la propuesta de uso, la optimización, la estandarización, la repetibilidad, la sensibilidad

analítica, la especificidad analítica, el punto de corte, la sensibilidad diagnóstica, la especificidad diagnóstica, la reproducibilidad y adecuación a la finalidad de la propuesta de uso.

En la segunda etapa de este trabajo, el protocolo de expresión y purificación mostraron ser eficientes, una vez que permitieron la producción de la proteína recombinante en cantidad suficiente para la purificación a partir de 200 mL de cultura. La proteína r-p24 purificada por IMAC, con el uso de elución escalonada, demostró una buena resolución en el proceso de purificación en lo que se refiere a la homogeneidad de la proteína, presentando dos picos cromatográficos. La caracterización físico-química demostró la presencia de una banda mayoritaria con peso molecular estimado en 24,66 kDa, correspondiendo a la proteína r-p24. En el análisis de la reactividad de la proteína r-p24 purificada por Western Blot, se pudo observar que los anticuerpos anti-VIF presentes en el suero reaccionaron con una banda en la región de 25 kDa, confirmando, así, la identidad de la proteína r-p24 purificada.

En la tercera etapa de este trabajo, fueron colectadas 251 muestras de sangre de gatos. El cromatograma de la purificación de la IgG de gato presentó un perfil de elución con la presencia de tres picos principales, cuando sometidas a gradiente discontinuo de NaCl. El análisis de la homogeneidad en SDS-PAGE 8-25% de la fracción de IgG de gato purificada, en la ausencia de agente reductor, evidenció una banda de alto peso molecular, encima del estándar de peso molecular 150kDa. La muestra aplicada con agente reductor evidencia la presencia de dos bandas con peso molecular estimado en 25 kDa y 50 kDa correspondiendo a las cadenas leves y pesadas del IgG.

En la cuarta etapa de este trabajo, el monitoreo de la producción de anticuerpos IgY anti-IgG de gato en las gallinas ponedoras demostró que las gallinas produjeron anticuerpos IgY anti-IgG de gato en el primer mes, pero la mayor concentración de estos anticuerpos fue encontrada después del segundo mes y se mantuvo elevada hasta el final del experimento. El análisis estadístico mostró un incremento significativo en la producción de inmunoglobulinas solamente del mes uno al mes 2 del experimento. El promedio mensual de la concentración proteica de la IgY estimado a 280 nm de las gallinas mostró una variación de 32,8 a 36,9 mg/mL, alcanzando el pico máximo en el cuarto mes de experimento. El cromatograma de la purificación de la IgY en columna HiTrap IgY 5mL presentó un perfil de elución con la presencia de una banda cuando sometida al tampón de elución con un pico mayoritario, el cual fue sometido a ultrafiltración, obteniéndose un volumen final de 1,5 mL y la concentración proteica de 5,37 mg/mL. La caracterización físico-química en SDS-PAGE demostró que la IgY precipitada con PEG 6000 en condiciones reductoras presentó diversas bandas con pesos moleculares que varían de 220 kDa a 25kDa. A IgY después de la purificación en HiTrap en condiciones reductoras reveló la presencia de dos bandas, con pesos moleculares estimados en 78 kDa y 26 kDa. La IgY purificada en HyTrap en condiciones no reductoras reveló una banda con peso estimado en 260 kDa. La reactividad cruzada de la IgY por Western Blot demostró que la IgY purificada fue capaz de reconocer de manera específica solamente a IgG de gato purificada, permaneciendo sin reacción las IgG de otros mamíferos. El análisis de la estandarización de la ELISA r-p24 IgY presentada por la titulación cruzada realizada con la proteína r-p24 y el conjugado IgY demostró que las condiciones ideales fueron: 200 ng/pozo de la proteína r-p24 para la sensibilización de las placas, las muestras de sueros de gatos diluidas 1/50 y el conjugado IgY/HRP diluido 1/2000. La validación de la prueba ELISA r-p24 IgY presentó una sensibilidad analítica con el límite de detección en la dilución máxima de la muestra de 1/800 ( $DO = 0,108$ ), y la especificidad analítica demostró que las 28 muestras positivas para FeLV no presentaron resultado falso positivo para el VIF y las 4 muestras de coinfección fueron positivas solamente para VIF. La prueba ELISA r-p24 IgY con la muestra de referencia positiva presentó reactividad en todas las replicatas y el coeficiente de variación fue de 4,7%, y con la muestra de referencia

negativa presentó resultado negativo en todas las replicatas y el coeficiente de variación fue de 8,0%. La muestra de referencia positiva presentó reactividad en todas las replicatas y el coeficiente de variación fue de 6,27%, la muestra de referencia negativa presentó resultados negativos en todas las replicatas y el coeficiente de variación fue de 5,28%. La comparación entre los resultados de la ELISA r-p24 IgY en relación a los resultados del SNAP® VIF/FeLV Combo VIF/FeLV Combo test mostró que de 251 muestras de sueros de gatos analizados en ambas las pruebas, 43 (17,2%) fueron positivas y 208 (82,8%) fueron negativas utilizando la prueba SNAP® VIF/FeLV Combo. La ELISA r-p24 IgY identificó 44 (17,5%) muestras positivas y 207 (82,4%) muestras negativas. Por lo tanto, dos muestras presentaron resultados discordantes. Los resultados de desempeño de la ELISA r-p24 IgY, en comparación con el ensayo de referencia, demostró la sensibilidad diagnóstica de 97,7%, la especificidad diagnóstica de 99,5%, la precisión de 99,2% y el índice kappa de 99,1%. La precisión fue de 0,9968 entre las pruebas evaluadas con el 95% en el intervalo de confianza variando de 0.9903 a 1.003. El resultado del estudio de estabilidad del kit ELISA r-p24 IgY durante el periodo mínimo de 12 meses demostró que el coeficiente de variación quedó entre 0,8% y 7,4%, en las diferentes condiciones de almacenamiento.

En la quinta etapa de este trabajo, el estudio comparativo de ELISA r-p24 IgY y ELISA r-p24 IgG demostró una sensibilidad de 95,3%, la especificidad de 99%, la precisión de 98,4%, y el índice kappa de 94,3%.

#### **4. Discusión**

La consulta a los documentos internacionales potencializó tanto la inclusión como el esclarecimiento de determinados parámetros de desempeño o criterios de validación de métodos para el desarrollo de este nuevo producto para el diagnóstico del VIF, denominado ELISA r-p24 IgY. La utilización de procedimientos cromatográficos automatizados en el proceso de validación de ensayos veterinarios para garantizar la resolución, la adecuada separación (pureza) de los picos cromatográficos y la utilización de pruebas de resolución de pico (por ejemplo, con auxilio de detector de aplicaciones de fotodiodos) son procedimientos recomendados por el MAPA (2003). El conjunto de los resultados obtenidos mostraron que el inóculo IgG de gato purificado por cromatografía de intercambio iónico asociado al esquema utilizado para inmunización de las gallinas, se mostró eficiente para la producción de IgY. Además, el aislamiento con PEG 6000 y la purificación por cromatografía de adsorción tiofílica permitió la obtención de la IgY con elevado grado de homogeneidad, usando un proceso simple y reproducible en el cual la actividad de los anticuerpos IgY fue preservada.

La validación de pruebas diagnósticas es un proceso que determina la capacidad de un ensayo, el cual fue debidamente desarrollado, optimizado y estandarizado, para un fin pretendido. Por lo tanto, la validación es necesaria para evaluar el desempeño analítico y diagnóstico y, así, demostrar confiabilidad en la prueba desarrollada.

En este trabajo, el bienestar animal y la producción y purificación de anticuerpos anti-IgG de gato y de huevos de gallina fue promisor, lo que hace que la producción de otros anticuerpos también pueda ser evaluada por el mismo método. La utilización del esquema de inmunización evaluado puede servir como modelo para la producción de IgY contra otros tipos de antígenos. El método de extracción de lípidos y la aplicación de la molécula de PEG 6000 en la yema puede ser utilizado en cualquier estudio. El dominio de la tecnología IgY podrá abrir cupos para otras aplicaciones en áreas como el diagnóstico de enfermedades en medicina humana y veterinaria. También podrá contribuir con la investigación y el desarrollo de nuevos ensayos, atendiendo a las normas y directrices nacionales e internacionales, tanto de bienestar animal como de validación, motivando el desarrollo nacional de kits diagnósticos de interés en salud humana o animal.

## 5. Conclusiones

El antígeno recombinante p-24 del VIF producido en sistema procarioto seguido del proceso de purificación adaptado a la producción en larga escala permitió la estandarización de las pruebas ELISA r-p24 IgY para el diagnóstico de la infección por el VIF. La producción de los anticuerpos IgY específicos para IgG de gato, utilizando aves ponedoras es una tecnología accesible. La IgY anti-IgG de gato es un insumo en potencial para ser utilizado como conjugado en un ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico del VIF. El kit ELISA r-p24 IgY presentó desempeño compatible a los criterios internacionales para la finalidad de diagnóstico para el VIF. La ELISA r-p24 IgY posee características deseables para el uso comercial, tales como alta precisión y largo periodo de mantenimiento de reactividad.

**Palabras clave:** IgY. ELISA. Virus de inmunodeficiencia felina.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da IgY de aves e IgG de mamíferos. Fonte: WARR et al., 1995. .... 3
- Figura 2.** Propriedades da IgY e da IgG. Fonte: Ingredientsinside (2016). .... 7
- Figura 3.** Estrutura do FIV. PR, protease; RT, transcriptase reversa; IN, integrase; DU, deoxiuridina trifosfatase; SU, glicoproteína de superfície do envelope; TM, glicoproteína transmembranar do envelope; MA, matriz; CA, capsídeo e NC, nucleocapsídeo. Lecollinet e Richardson (2008). .... 10
- Figura 4.** Organização do genoma do FIV. O gene *gag* (*Antígeno Grupo-específico*) codifica as proteínas que constituem a matriz (MA), o nucleocapsídeo (NC) e o capsídeo (CA). Gene *pol* codifica quatro proteínas enzimáticas, protease (PR), transcriptase reversa (RT), deoxiuridina trifosfatase (DU), e a integrase (IN). Gene *env* codifica as duas glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranar (TM). LTR: *Long terminal repeats*. Genes acessórios *vif*, *ORF-A* e *rev* codificam as proteínas envolvidas na regulação da replicação viral. Willett, B. (2013). .... 11
- Figura 5.** Distribuição global dos subtipos do FIV. HOSIE et al., 2009. .... 11
- Figura 6.** Patogenia do FIV. PVL, carga viral plasmática; CTL, linfócitos T citotóxicos; SU, glicoproteína do Env; p24, proteína do capsídeo viral. Bęczkowski (2012). .... 13
- Figura 7.** Fases do processo de desenvolvimento e validação de um teste diagnóstico para uso veterinário. Os critérios de validação em negrito e sombreado. Adaptado da OIE (2016 b). .... 17
- Figura 8.** Teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo, IDEXX Laboratories, Inc. Fonte: <http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2010/felv/diagnosis.html> ..... 29
- Figura 9.** Análise da proteína r-p24. **Painel A** - Perfil cromatográfico obtido a partir da purificação da proteína r-p24 em HisTrap 5 mL crude FF. A linha contínua representa a absorbância a 280nm; a linha pontilhada representa a concentração do eluente **B. Painel B** - Análise em SDS-PAGE 8-25% das frações da proteína r-p24 em condições redutoras; Raia 1- Proteína r-p24 antes da purificação; Raia 2- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad) em kDa; Raia 3- Proteína r-p24 após purificação e concentração. A curva de calibração apresentou R<sup>2</sup> de 0,991. **Painel C** - Western Blot da proteína r-p24. Raia 1- Amostra do soro de gato, positiva para FIV; Raia 2- Amostra de soro de gato, negativa para FIV. As setas indicam a proteína r-p24. .... 31
- Figura 10.** Análise da IgG de gato. **Painel A** - Perfil cromatográfico da purificação da IgG de gato em coluna de afinidade Hitrap Q FF 1mL. A linha contínua representa a absorbância a 220nm; A linha pontilhada representa a concentração do eluente **B.** As setas indicam as cadeias pesadas (H), leves (L) e pesadas e leves (H+L) da IgG de gato. **Painel B** - Análise em SDS-PAGE 8-25% da fração da IgG de gato. Raia 1- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad) em kDa; Raia 2- IgG de gato purificada sem agente redutor. Raia 3- IgG de gato purificada com agente redutor. .... 32
- Figura 11.** Perfil da produção de imunoglobulina Y nos ovos das galinhas imunizadas com IgG de gato. (IR = Índice de reatividade. As barras verticais indicam o desvio padrão. As setas indicam os momentos das quatro imunizações nos intervalos de 1, 15, 30 e 66 dias. .... 33
- Figura 12.** Média da concentração de proteína total na gema dos ovos das galinhas. Ovos coletados durante o período de cinco meses e purificados com PEG expressos em mg/mL. As barras verticais indicam o desvio padrão. .... 33



- Figura 13.** Análise da IgY. **Painel A** - Perfil cromatográfico da purificação da IgY em coluna HiTrap IgY 5mL. A linha contínua representa a absorbância a 220nm; a linha pontilhada representa a concentração do eluente B. A seta indica a fração de interesse. **Painel B** - Análise por SDS-PAGE da IgY em condições redutoras; Raia 1- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad) em kDa; Raia 2- IgY após a purificação por PEG 6000; Raia 3- IgY após purificação em HiTrap em condições redutoras; Raia 4- IgY purificada em HyTrap em condições não redutoras. A curva de calibração apresentou  $R^2$  de 0,99. As setas indicam as cadeias pesadas (H), leves (L) e pesadas e leves (H+L) da IgY. **Painel C** - Análise por Western Blot da IgY purificada anti-IgG de gato. Raia1- IgG de coelho; Raia 2- IgG de cavalo; Raia 3- IgG de cão; Raia 4- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad); Raia 5- IgG de gato; Raia 6- IgG de cabra; Raia 7- IgG de carneiro; Raia 8- IgG de cobaia. A seta indica a reação da IgY purificada com a IgG de gato. .... 34
- Figura 14.** Otimização do ELISA r-p24 IgY. Relação da média DO450 das amostras de referência positivas e negativas na diluições 1:50 e 1: 100; antígeno r-p24 nas concentrações 25, 50, 100 e 200 ng / 100 uL; IgY anti-IgG de gato conjugada nas diluições 1: 1000, 1: 2000, 1: 4000, 1: 8000, 1: 16000. Razão do conjugado (403:280) = 0,32. .... 35
- Figura 15.** Curva ROC do ELISA r-p24 IgY. Demonstração da sensibilidade em função da especificidade. .... 37
- Figura 16.** Estudo da estabilidade do *kit* ELISA r-p24 IgY. O gráfico apresenta o índice de reatividade do kit ELISA r-p24 IgY submetido a diferentes condições de armazenamento durante 12 meses. As barras sólidas representam a amostra de referência positiva para o FIV e as barras pontilhadas representam a amostra de referência negativa para o FIV. As barras verticais indicam o desvio padrão. .... 37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação entre a produção de anticorpos de mamíferos e aves. ....	5
<b>Tabela 2.</b> Componentes da gema do ovo. (SCHADE et al., 2000).....	5
<b>Tabela 3.</b> Principais métodos de extração da IgY da gema do ovo. ....	6
<b>Tabela 4.</b> Principais métodos de purificação da IgY. ....	6
<b>Tabela 5.</b> Exemplos de vírus de gatos domésticos com homólogos humanos. ....	9
<b>Tabela 6.</b> Comparação de sete testes comerciais para a detecção de anticorpos contra o FIV. .....	14
<b>Tabela 7.</b> Organização das etapas do delineamento do estudo. ....	21
<b>Tabela 8.</b> Dados de contingência comparando os resultados do ELISA r-p24 IgY e o SNAP® FIV/FeLV Combo. ....	36
<b>Tabela 9.</b> Avaliação dos parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgY.....	36
<b>Tabela 10.</b> Dados de Contingência comparando os resultados do ELISA r-p24 IgG e o SNAP® FIV/FeLV Combo. ....	38
<b>Tabela 11.</b> Avaliação dos parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgG.....	38
<b>Tabela 12.</b> Avaliação da comparação dos parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgY e do ELISA r-p24 IgG. ....	38

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. Histórico da IgY.....	2
2.1.1. Características da IgY .....	2
2.1.2. Produção da IgY.....	4
2.1.3. Isolamento e purificação da IgY .....	5
2.1.4. Aplicações da tecnologia IgY no imunodiagnóstico.....	7
2.2. A Síndrome da Imunodeficiência Felina .....	8
2.2.1. A infecção pelo vírus da imunodeficiência felina.....	9
2.2.2. Estrutura do FIV.....	10
2.2.3. Epidemiologia do FIV .....	11
2.2.4. Transmissão do FIV .....	12
2.2.5. Patogenia da infecção pelo FIV .....	12
2.2.6. Diagnóstico da infecção pelo FIV .....	13
2.3. Desenvolvimento e Validação de um Teste para Uso Veterinário .....	14
2.3.1. Primeira etapa do processo de validação .....	17
2.3.2. Segunda etapa do processo de validação .....	18
2.3.3. Terceira etapa do processo de validação.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Delineamento do Estudo.....	21
3.2. Análise de Critérios e Procedimentos para Validação do Teste Desenvolvido .....	22
3.3. Produção da Proteína Recombinante r-p24 .....	22
3.3.1. Obtenção da biomassa.....	22
3.3.2. Purificação da proteína r-p24 .....	23
3.3.3. Análise da homogeneidade da proteína r-p24 por SDS-PAGE .....	23
3.3.4. Análise da pureza e especificidade da proteína r-p24 por <i>Western Blot</i> .....	23
3.4. Produção de Anticorpos IgY anti-IgG de Gato.....	24
3.4.1. Coleta de amostras de sangue de gatos .....	24
3.4.2. Obtenção e purificação da IgG de gato .....	24
3.4.3. Desenho experimental para a obtenção da IgY .....	25
3.4.4. Monitoramento da produção de IgY .....	25
3.4.5. Processamento e purificação da IgY .....	25

3.4.6. Análise da homogeneidade e especificidade IgY.....	26
3.5. Desenvolvimento do ELISA r-p24 IgY para Diagnóstico do FIV .....	26
3.5.1. Preparo das amostras de referência .....	26
3.5.2. Preparo da IgY anti-IgG de gato conjugada à peroxidase.....	27
3.5.3. Padronização do Elisa r-p24 IgY empregando as amostras de referência .....	27
3.5.4. Estabelecimento do ponto de corte .....	28
3.6. Validação do <i>Kit</i> de Elisa r-p24 IgY para Diagnóstico do FIV .....	28
3.6.1. Sensibilidade e especificidade.....	28
3.6.2. Repetitividade .....	28
3.6.3. Precisão intermediária.....	28
3.6.4. Concordância de desempenho do ELISA r-p24 IgY com o kit comercial.....	29
3.6.5. Estudos de estabilidade .....	29
3.7. Comparação do ELISAr-p24 IgY com o ELISA Utilizando Imunoglobulina de Mamífero Conjugada à HRP (ELISA r-p24 IgG).....	30
3.8. Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1. Análise da Proteína r-p24: Produção, Purificação e Caracterização Físico-Química e Biológica.....	31
4.2. Análise da IgG de Gato: Produção, Purificação e Caracterização Físico-Química.....	32
4.3. Análise da IgY: Produção, Purificação e Caracterização Físico-Química e Biológica	32
4.4. Análise da Padronização do ELISA r-p24 IgY .....	35
4.5. Validação do <i>Kit</i> de ELISA r-p24 IgY .....	35
4.5.1. Sensibilidade e especificidade.....	35
4.5.2. Repetitividade .....	36
4.5.3. Precisão intermediária.....	36
4.5.4. Estudo comparativo de desempenho do ELISA r-p24 IgY com o teste de referência.....	36
4.5.5. Estudos de estabilidade .....	37
4.6. Estudo Comparativo de ELISA r-p24 IgY e ELISA r-p24 IgG .....	38
5. DISCUSSÃO .....	39
6. CONCLUSÕES .....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

Os anticorpos policlonais específicos podem ser obtidos em grandes quantidades a partir da gema do ovo de galinhas imunizadas, denominados anticorpos IgY. Embora com funcionalidade semelhante aos anticorpos IgG de mamíferos, os anticorpos IgY apresentam vantagens para a produção de imunobiológicos: (i) obtenção sem estresse para o animal; (ii) menor número de animais utilizados na produção; (iii) grandes concentrações de anticorpos por gema; (iv) ausência de interferência do fator reumatóide e das proteínas do sistema de complemento dos mamíferos, e (v) interação apenas com os receptores Fc de galinha (SCHADE e HILINAK., 1996).

As imunoglobulinas de mamíferos são obtidas normalmente por meio do uso de animais de laboratório, principalmente coelhos, cobaias e camundongos, mas também animais de médio e grande porte, como cavalos, cabras, dentre outros. O procedimento de inoculação e coleta de sangue destes animais causa sofrimento e estresse, podendo levá-los à morte. Em contraposição, a extração da IgY é feita a partir da gema do ovo de aves poedeiras e a utilização da tecnologia IgY está de acordo com os esforços internacionais para reduzir, refinar e substituir animais de experimentação, contribuindo a favor do bem-estar animal.

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) tem sido alvo de muitos estudos, pois causa distúrbios imunológicos associados a infecções oportunistas e neoplásicas em gatos domésticos que podem ser fatais. Além disso, se trata de uma doença de difícil diagnóstico clínico, uma vez que o gato pode apresentar uma grande variedade de sinais clínicos inespecíficos, necessitando de métodos de diagnósticos laboratoriais específicos.

No Brasil, elevados custos dos insumos e *kits* importados para diagnóstico de diversas enfermidades humanas e animais estimulam o desenvolvimento de testes com tecnologia nacional. No entanto, um guia ou protocolo prático que normatize o desenvolvimento e a validação de testes de diagnóstico animal não está disponível. O esclarecimento de parágrafos pouco precisos é, às vezes, obtido nas legislações ou orientações estrangeiras. Sendo assim, há a necessidade de analisar as documentações pertinentes de produção e validação de produtos para diagnóstico para uso veterinário, tanto nacional como internacional, e estabelecer procedimentos para o desenvolvimento e fabricação de imunorreagentes.

Neste contexto, a aplicação da tecnologia IgY no desenvolvimento do teste ELISA nacional para a detecção de anticorpos contra o FIV possibilitará o estabelecimento de um modelo de produção para imunobiológicos na área de medicina veterinária.

O objetivo geral do estudo é aplicar a tecnologia IgY no desenvolvimento de um teste imunoenzimático ELISA para o diagnóstico da FIV, contribuindo no estabelecimento de um modelo de produção para um *kit* nacional na área de medicina veterinária.

Como objetivos específicos: i) Aplicar um modelo de procedimentos, descrevendo desde a concepção da ideia de um novo produto, passando pelas etapas de desenvolvimento e validação de um imunodiagnóstico; ii) Produzir, isolar, purificar e caracterizar físico-química e biologicamente o antígeno recombinante r-p24 presente no capsídeo do FIV; iii) Produzir, isolar, purificar e caracterizar físico-quimicamente a IgG de gato; iv) Produzir, isolar, purificar e caracterizar físico-química e biologicamente a IgY específica para IgG de gato utilizando aves poedeiras; v) Desenvolver e validar o teste ELISA r-p24 IgY utilizando IgY anti-IgG de gato para o diagnóstico da infecção pelo FIV. e vi) Comparar o desempenho do ELISA r-p24 IgY com o ELISA r-p24 IgG que utiliza anti-IgG de gato produzida em mamíferos para o diagnóstico da FIV.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico da IgY

A denominação “tecnologia IgY” é o termo internacionalmente aceito para descrever a produção e utilização da imunoglobulina Y (IgY) que é o principal anticorpo de aves, répteis e peixes pulmonados (WARR et al., 1995).

Em 1893, Klemperer descreveu um experimento demonstrando que a imunização de uma galinha resultava na transferência de anticorpos específicos para a gema do ovo. Um grupo de galinhas foi imunizado repetidas vezes com toxina tetânica não purificada, obtida de caldo de cultivo de *Clostridium tetani*. O extrato obtido nas gemas de ovos foi utilizado para inocular camundongos em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram que somente os camundongos imunizados com altas concentrações da solução imunoprotetora proveniente dos extratos das gemas, sobreviveram quando desafiados com doses letais da cultura tetânica (KLEMPERER, 1893).

Por um longo período não existiu aplicação científica para esse conhecimento, mas quando o bem-estar animal se tornou uma questão de preocupação ética para a comunidade científica, os resultados de Kemperer ganharam interesse. No fim da década de 50, Russell e Burch publicaram o livro “*The principles of Humane Experimental Techniques*”, no qual citaram a técnica de purificação de imunoglobulinas, a partir de ovos de galinha, como uma técnica alternativa para reduzir o sofrimento de animais utilizados na pesquisa, e também, uma discussão detalhada do proposto programa 3Rs para experimentação animal. O princípio dos 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1. redução (Reduction), 2. refinamento (Refinement) e 3. substituição (Replacement), que de forma resumida significam a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que, por fim, substituam os testes “*in vivo*” (RUSSEL; BURCH, 1992).

Desta forma, o propósito principal do programa 3Rs é servir como um conceito unificador, um desafio e uma oportunidade para a obtenção de benefícios científicos, econômicos e humanitários (BALLS et al., 2000). Pouca atenção foi dispensada à concepção dos 3Rs na década de 60. Alguns acontecimentos nesta área ocorreram nos anos 70 e 80, porém, somente em 1996, um *workshop* do Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) recomendou o uso de IgY em substituição a IgG de mamíferos, promovendo a aceitação e regulamentação do princípio dos 3Rs no uso de animais de laboratório. Em 1999, a tecnologia IgY foi aprovada pelo *Office Vétérinaire Federal* (Escritório Veterinário Federal do Governo Suíço), como um método alternativo que visa o bem-estar dos animais (SCHADE et al., 2005).

Atualmente, o potencial de aplicação dos anticorpos aviários tem fomentado grande interesse na área científica, devido a diversidade de aplicações diagnósticas e terapêuticas nas pesquisas biomédicas (CARLANDER et al., 2000; BIZANOV et al., 2004).

#### 2.1.1. Características da IgY

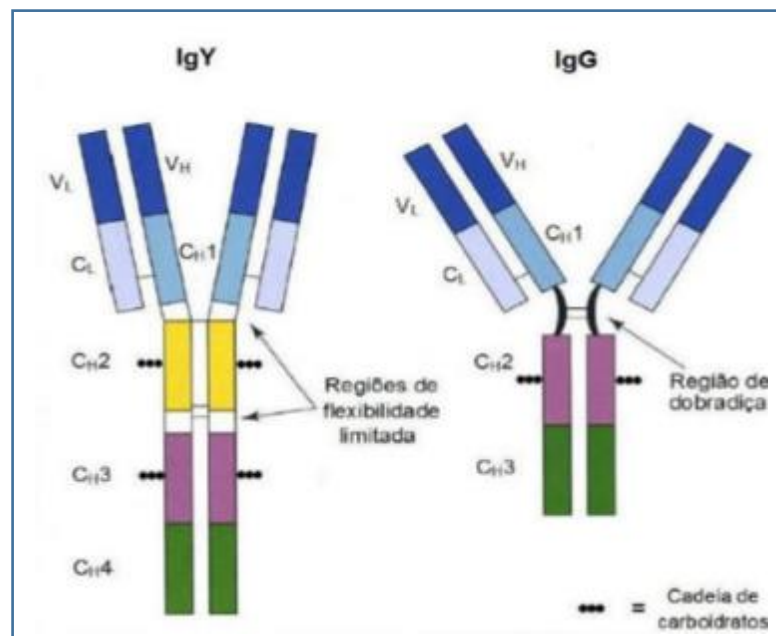
##### a) Estrutura

As imunoglobulinas das aves são glicoproteínas sintetizadas pelos plasmócitos e são divididas em três classes: IgM, IgA e IgY. A imunoglobulina Y é o principal anticorpo produzido nas aves e apresenta funções equivalentes à IgG de mamíferos, sendo a IgM e a IgA homólogas às de mamíferos (WARR et al., 1995).

A imunoglobulina M tem estrutura e propriedades semelhantes à dos mamíferos, sendo encontrada, preferencialmente, no soro e sua concentração varia de 0,70 mg/mL a 1,25 mg/mL. A IgM é depositada na clara do ovo, mas também pode ser detectada na bile, conteúdo intestinal e no líquido seminal. É formada por cinco monômeros, originando uma estrutura polimérica com cerca de 900 kDa (TIZARD, 2002).

A imunoglobulina A é produzida nos tecidos linfóides da vesícula biliar e trato intestinal, é encontrada na bile, fluídos intestinais e secreções respiratórias e depositada na clara do ovo. É encontrada nas formas dimérica (340 kDa) e monomérica (170 kDa). A concentração sérica da IgA está em torno de 0,6 mg/mL (TIZARD, 2002).

A estrutura geral da IgY é diferente da IgG de mamíferos, embora haja semelhança na sua função (CARLANDER et al., 1999). A IgY contém duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), com massa molecular de, aproximadamente, 180 kDa, maior que a IgG de mamífero (150 kDa). A IgY possui a cadeia H com maior massa molecular (68 kDa) quando comparada com a de mamíferos (50 kDa). A cadeia pesada H da IgG consiste de quatro domínios: um domínio variável (VH) e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). O domínio CH1 é separado do CH2 pela região de dobradiça, conferindo considerável flexibilidade ao fragmento de ligação antígeno-anticorpo (Fab). A cadeia H da IgY não possui a região da dobradiça e apresenta quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4) e um domínio variável (VH). Entre os domínios CH1-CH2 e CH2-CH3 resíduos de prolina e glicina conferem limitada flexibilidade à molécula (NARAT, 2003) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da IgY de aves e IgG de mamíferos. Fonte:WARR et al., 1995.

Em alguns pássaros anseriformes (gansos e patos) e répteis foi identificada a forma truncada de IgY ( $\Delta$ Fc) de origem ainda desconhecida. A IgY truncada não possui os dois domínios C-terminais (CH<sub>3</sub> e CH<sub>4</sub>) da cadeia pesada, e possui peso molecular mais baixo, por volta de 120 kDa. Ambas as formas de IgY podem ser encontradas em um mesmo indivíduo, como ocorre em alguns patos e gansos, ou apenas a forma inteira pode estar presente, como ocorre em *Gallus domesticus* (TIZARD, 2002; KITAGUCHI et al., 2008).

## **b) Propriedades físico-químicas**

O ponto isoelétrico da IgY está compreendido entre 5,7 e 7,6, enquanto a IgG de mamíferos que está compreendida entre 6,1 e 8,5 (POLSON et al., 1980; SUN et al., 2001). A região Fc é a parte mais hidrofóbica na molécula do anticorpo e, como esta região é maior na IgY que na IgG, a molécula de IgY é mais hidrofóbica que a molécula de IgG (DÁVALOS-PANTOJA et al., 2000). A IgY também é relativamente estável a pressão, não havendo inativação até 4.000 kg/cm<sup>2</sup> (SHIMIZU et al., 1994).

Sob condições ácidas, em pH 3,5 a atividade da IgY foi bastante reduzida e, em pH 3,0 ocorreu a perda completa da sua atividade (HATTA et al., 1993; SHIMIZU et al., 1993). A atividade da IgY nas condições alcalinas não se altera até atingir pH 11, mas é reduzida, significativamente, em pH igual ou superior a 12 (SHIMIZU et al., 1992).

A estabilidade da IgY frente à variação de temperatura e pH tem sido estudada em várias condições. Em temperaturas acima de 70°C, a IgY perde grande parte de sua atividade; a 60°C por 10 minutos, perde, aproximadamente, 20% da sua atividade, e a 40°C permanece estável (SHIMIZU et al., 1988; SHIMIZU et al., 1992; HATTA et al., 1993; SHIN et al., 2002). O efeito da temperatura sobre a estabilidade mostrou que a atividade da IgY se manteve durante mais de cinco meses no armazenamento a -20°C, 4°C ou temperatura ambiente (FU et al., 2006), o mesmo ocorrendo após a liofilização (SHIMIZU et al., 1988).

## **c) Propriedades imunológicas**

Os órgãos responsáveis pela produção de anticorpos nas galinhas diferem daqueles dos mamíferos. Os órgãos linfóides primários das galinhas consiste na bursa de Fabricius e do timo, enquanto os órgãos secundários são compostos pelo baço, glândulas Harderianas, medula óssea e tecidos linfóides conjuntival, bronquial e intestinos associados. A bursa de Fabricius, órgão exclusivo das aves, é o órgão linfóide responsável pela maturação de linfócitos B (McCORMACK et al., 1989). O timo é o sítio de diferenciação de células tronco em células T, e a proliferação de plasmócitos ocorre no baço onde as células B estão localizadas (CARLANDER et al., 1999).

### **2.1.2. Produção da IgY**

O desenvolvimento e a produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados pela imunização de aves poedeiras com o antígeno alvo. O antígeno pode ser apresentado ao sistema imune como estruturas complexas (bactéria, vírus e parasitas) ou simples (proteínas, polissacarídeos e toxinas) (SCHADE et al., 2005). Entretanto, o resultado da resposta imune das aves imunizadas não pode ser previsto. Dentre outros fatores, dois são muito importantes e influenciam diretamente esta resposta: tipo de adjuvante usado e a via de administração do antígeno (SCHADE; HILINAK, 1996).

Para a indução de altos e sustentáveis títulos de anticorpos emprega-se um adjuvante. Entretanto, a imunização das aves sem o uso de qualquer adjuvante também pode resultar em títulos aceitáveis de um anticorpo (GUTIÉRREZ et al., 2001). O adjuvante considerado padrão ouro, em termos de indução da resposta imune específica é o adjuvante completo de Freund (CFA), que contém micobactérias mortas pelo calor (LÉVESQUE et al., 2007). Atualmente, o CFA em mamíferos tem sido utilizado com menos frequência devido a alguns trabalhos associarem processos inflamatórios graves e necrose tecidual no local da inoculação da aplicação desse adjuvante (WANKE et al., 1996).

As inoculações com o antígeno para a obtenção de anticorpos IgY podem ser feitas por via intramuscular, no músculo peitoral, embora também foi descrita a inoculação subcutânea (WOOLLEY; LANDON, 1995; SCHADE; HILINAK, 1996; CARLANDER et al., 2002). A imunização com o antígeno por via intramuscular resulta, frequentemente, em níveis mais



elevados de anticorpos 28 dias após a imunização (WOOLEY; LANDON,1995). Galinhas inoculadas por via intramuscular continuam a produzir anticorpos específicos durante mais de 200 dias ou por todo o período de postura (SCHADE ; HILINAK, 1996).

A concentração de IgY no soro de galinhas adultas é de aproximadamente 5,0 a 7,0 mg/mL. A galinha poedeira produz em média 20 ovos por mês e podem ser isoladas, aproximadamente, 2,0 gramas de IgY neste período, que corresponde a cerca do teor de IgG de 300 mL de soro ou de 600 mL de sangue (SHIMIZU et al., 1994). Este volume de sangue é obtido apenas em mamíferos de grande porte. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre a produção de anticorpos de mamíferos (coelho) e em aves (galinhas).

**Tabela 1.** Comparação entre a produção de anticorpos de mamíferos e aves.

<b>Espécie</b>	<b>Coelho</b>	<b>Galinha</b>
Número de animais	1	1
Amostra	Coleta de sangue (20 mL/semana)	Coleta diária de ovos
Volume da amostra (em 2 semanas)	40 mL de sangue	14 ovos = 210 mL de gemas <sup>a</sup>
Anticorpos totais	200 mg	1120 mg <sup>b</sup>
Anticorpos específicos	5% (10 mg)	2-10% (22.41 mg)
Coelho/galinha- total <sup>c</sup>	5-6	1
Coelho/galinha-específicos <sup>d</sup>	2-11	1
Presença de outras Ig	IgM, IgA, IgE	Nenhuma

<sup>a</sup> Volume médio por gema igual a 15 mL.

<sup>b</sup> Quantidade média de IgY igual a 80 mg por gema.

<sup>c</sup> Número de coelhos que produzem igual quantidade de anticorpos por galinha em 2 semanas.

<sup>d</sup> Número de coelhos que produzem igual quantidade de anticorpos específicos por galinha em 2 semanas.

Fonte: NARAT, 2003.

### 2.1.3. Isolamento e purificação da IgY

A gema do ovo da galinha consiste de 51,3% de matéria seca e 48,7% de água contendo proteínas e uma porção dispersa chamada de grânulos de gema e gotas de lipídeos (FISHER;HLINAK, 1996), conforme a Tabela 2 a seguir.

**Tabela 2.** Componentes da gema do ovo. (SCHADE et al., 2000).

<b>Componentes</b>	<b>Porcentagem</b>
Lipídeos e gorduras	32,6%
Proteínas	16%
Carboidratos	1%
Matéria inorgânica	1,1%

Fonte: SCHADE et al., 2000.

O processo de extração sempre se inicia pela separação da gema e da clara. Para separar a fase aquosa da gema utilizam-se solventes orgânicos, substâncias hidrófilas ou congelamento a - 20° C. Este processo é denominado delipidação (SCHADE et al., 2001). Os principais métodos de extração estão descritos na Tabela 3, a seguir.

**Tabela 3.** Principais métodos de extração da IgY da gema do ovo.

<b>Método</b>	<b>Referências</b>
Separação das lipoproteínas por ultracentrifugação	Mc Bee e Cotterill (1979)
Método da diluição em água	Jensenius et al., (1981); Akita e Nakai (1972)
Delipidação com solvente orgânico	Bade e Stegemann (1984); Polson (1990)
Precipitação das lipoproteínas por agentes precipitantes incluindo: Sulfato de sódio Dextran	Jensenius et al., (1981);
Poli(etil)enoglicol (PEG)	Polson et al., (1985)
Goma carragena e xantana	Hatta et al.,(1991)
Resina ácida poliacril	Hamada et al., (1991)
Remoção das lipoproteínas por interação com agentes químicos específicos incluindo: Ácido fosfotungstênico e cloreto de magnésio	Vieira et al., (1986)
Hidroxipropilmetilcelulose	Yokoyama et al., (1993)
Ácido caprílico	Svendsen et al., (1995)
Separação dos lipídeos e o método de diluição por água com fosfatos e Triton X-100	Stälberg e Larsson (2001)

Fonte: NAFEA, 2008.

Dentre os reagentes citados nas técnicas de precipitação citam-se o sulfato de sódio, ácido caprílico, dextransulfato, sulfato de amônio e poli(etil)enoglicol. Bernardo (2009), ao produzir anticorpos IgY contra *Leishmania amazonensis*, comparou as extrações realizadas com sulfato de amônio e poli(etil)enoglicol 6000 (PEG 6000) e constatou que, enquanto o primeiro apresentou maior rendimento, o segundo obteve maior pureza. O 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). O método tem como vantagem a possibilidade de manipulação em temperatura ambiente, sem risco de desnaturação da imunoglobulina (AKITA; NAKAI, 1993).

Em trabalhos descritos na literatura se utilizaram mais de um método de purificação para a obtenção da IgY. A escolha do método está na dependência da quantidade, pureza e atividade biológica desejada, assim como do custo da técnica. Os principais métodos cromatográficos para a purificação da IgY encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Principais métodos de purificação da IgY.

<b>Métodos de Purificação</b>	
<b>Cromatográficos</b>	<b>Referências</b>
Cromatografia de troca aniônica	Blade and Stegemann (1984); Akita e Nakai (1993)
Cromatografia de troca catiônica	Fichtali et al., (1992); Ko and Ahn (2006)
Cromatografia de exclusão e peneira molecular	Akita e Nakai (1992); Ko and Ahn (2006)
Cromatografia de interação com cobre	McCannel and Nakai (1989)

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

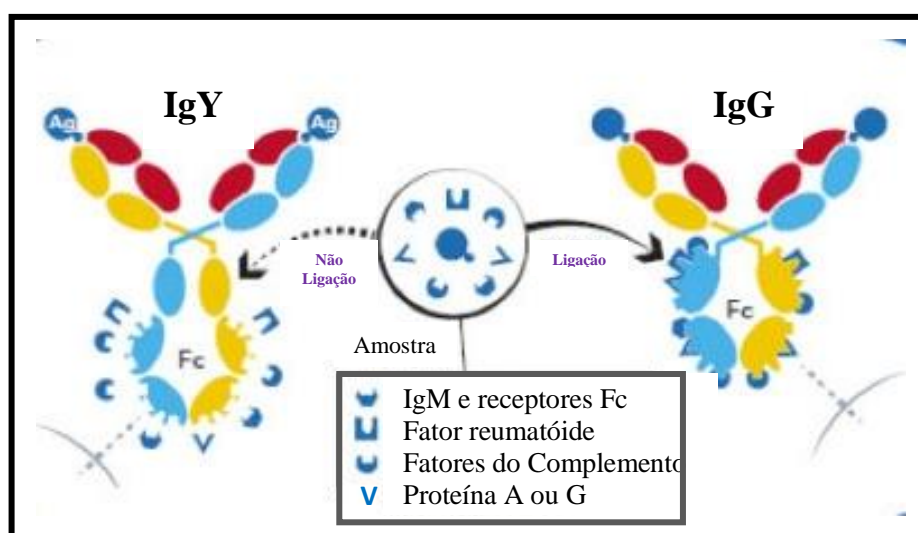
Métodos de Purificação	
Cromatográficos	Referências
Cromatografia de interação hidrofóbica	Hassel and Aspöch (1988)
Cromatografia de interação tiofílica	Hassel et al., (1998)
Cromatografia de afinidade (incluindo colunas com afinidade por antígeno, colunas imunosorventes e colunas de afinidade de ligante sintético)	Natkatourima et al., (1992); Li et al., (1998); Yazawa et al., (1991); Yokoyama et al., (1993); Fassina et al., (1998); Dong et al., (2008)
Ultrafiltração	Akita e Nakai (1992); Ko and Ahn (2006)
Eletroforese preparativa	Gee et al., (2003)

Fonte: NAFEA et al., 2008.

#### 2.1.4. Aplicações da tecnologia IgY no imunodiagnóstico

A IgY apresenta propriedades distintas que podem ser exploradas em vários campos da pesquisa, do diagnóstico e da terapia. Os estudos para elucidar as características morfológicas e funcionais da IgY iniciaram nos anos 70. A partir de então houve uma maior disponibilidade de reagentes tanto para a purificação como padrões e anticorpos marcados especificamente contra a IgY, impulsionando as aplicações no imunodiagnóstico.

A utilização da IgY aviária apresenta benefícios em testes imunológicos em que a interferência causada pelos anticorpos IgG podem alterar a sensibilidade do ensaio (Figura 2).



**Figura 2.** Propriedades da IgY e da IgG. Fonte: Ingredientsinside (2016).

Um exemplo da interferência causada pelos anticorpos IgG nos testes para diagnósticos é o fator reumatóide que reage com a IgG de diferentes espécies de mamíferos, e também com anticorpos monoclonais murinos (CARLANDER, 2002). O fator reumatóide é encontrado em pacientes com artrite reumatóide, e também em pacientes com outras doenças e, ainda, em 3-5% dos indivíduos saudáveis.

Outro fato relevante é o crescente número de pacientes tratados com anticorpos monoclonais murinos. Estes tratamentos, muitas vezes, estimulam uma reação imunológica - anticorpos humanos contra os de origem murina, denominada HAMA (*Human Anti-mouse Antibody*) contudo, estes anticorpos podem ser encontrados também no soro de pacientes que

não foram tratados com os anticorpos murinos. A utilização da IgY apresenta uma expressiva vantagem uma vez que não reage com o fator reumatóide ou com o HAMA (LARSSON et al., 1992).

Uma das possibilidades de resultados positivo falso nos testes de diagnóstico é a reação entre a região Fc dos anticorpos de mamíferos e a proteína A estafilocócica ou proteína G estreptocócica. Ao contrário da IgG, os anticorpos IgY não se ligam aos receptores Fc bacterianos, como a proteína A ou proteína G supracitados (JENSENIUS et al., 1981). O emprego da IgY em testes de diagnóstico pode ser uma ferramenta útil para contornar estas reações, entretanto, uma desvantagem é a impossibilidade de se utilizar a proteína A ou a proteína G, nos processos de purificação da IgY (SCHADE; HLINAK et al., 1996).

A distância filogenética entre aves e mamíferos possibilita uma maior probabilidade de indução da resposta imune contra antígenos ou epítomos que podem não ser imunogênicos em mamíferos. Devido a distância evolutiva, a IgY reconhece um maior número de epítomos quando o imunógeno é proveniente de uma proteína altamente conservada de mamífero. Esta característica pode resultar na amplificação do sinal, enfatizando as vantagens da utilização da IgY, em relação à IgG como anticorpo de captura, contribuindo para um melhor desempenho das reações imunológicas (CARLENDER, 2002).

A limitada flexibilidade da IgY aviária pode ser responsável pela incapacidade de precipitar antígenos em baixas concentrações de sal (WARR et al., 1995). A IgY e a IgY ( $\Delta$ Fc) possuem dois locais de ligação ao antígeno e deveriam, em princípio, precipitar ou aglutinar antígenos multivalentes, mas isso nem sempre ocorre, necessitando de concentrações de sal elevadas (1,5 M NaCl) (SHIMIZU et al., 1988). Os anticorpos de patos e gansos, geralmente, não apresentam reações de precipitação ou aglutinação, nem mesmo em concentrações elevadas de sal (HIGGINS et al., 1988; WARR et al., 1995).

O emprego da tecnologia IgY no desenvolvimento de anticorpos específicos para o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos foi obtido com grande êxito contra uma ampla variedade de antígenos, incluindo proteínas, peptídeos, hormônios, bactérias, fungos, plantas e animais (SCHADE et al., 1994). Vários estudos demonstraram resultados promissores para detecção de antígeno circulante de *Schistosoma Japonicum* (CAI et al., 2012), no desenvolvimento de anticorpos IgY contra as proteínas do *Pythium insidiosum* (RANGEL et al., 2010), no uso de um ELISA de captura para o vírus da febre aftosa (VEERASAMI et al., 2008). A otimização e validação de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo entre equinos, que tem como agente etiológico a bactéria *Burkholderia mallei*, demonstrou resultados de sensibilidade de 99,7% e especificidade de 100%, comparado ao teste ouro de fixação de complemento (SINGHA et al., 2014). Silva et al., (2012) utilizaram a IgY no desenvolvimento de um ELISA para o diagnóstico da hepatite A e os resultados demonstraram sensibilidade de 95% e especificidade de 98,8%. Do mesmo modo, Vasconcelos et al., (2015) demonstraram a utilização de IgY para a detecção do vírus da hepatite A (HAV) por imunofluorescência indireta, em cortes congelados de fígado de macacos cynomolgus inoculados com o vírus.

## **2.2. A síndrome da Imunodeficiência Felina**

Num primeiro momento, o grande benefício da domesticação do gato parece ser a companhia humana, mas esse papel tem se expandindo rapidamente para abranger questões na saúde humana. A infecção pelo FIV representa um risco pequeno ou ausente à saúde pública, semelhante a outros lentivirus, o FIV parece ser específico para a espécie. Contudo, os gatos com imunossupressão induzida pelo retrovírus podem servir como reservatório para diversas doenças como toxoplasmose e a criptosporidiose e, dessa forma, podem representar risco à saúde dos seres humanos (FERREIRA et al., 2011). Outras doenças infecciosas virais em

gatos tem padrões de evolução, virulência e patogenicidade que oferecem fortes paralelos com vírus relacionados em humanos. O coronavírus felino (FCoV), comum em gatos domésticos, é um parente próximo do coronavírus SARS humano que, em 2003, ocasionou 809 mortes em 29 países (WHO, 2003). Na década de 1960, a descoberta do vírus da leucemia felina e a sua capacidade para recombinar com oncogenes celulares do hospedeiro resultou em uma melhor compreensão de neoplasias de felinos e humanos (HARDY et al., 1980). Outros patógenos podem ser acrescentados a estes e a espécie felina pode ser apontada como modelo para o estudo de muitas doenças infecciosas humanas devastadoras, como pode ser observado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Exemplos de vírus de gatos domésticos com homólogos humanos.

<b>Vírus Felino</b>	<b>Homólogo Humano</b>
Vírus da Leucose Felina (FeLV)	Vírus Linfotrópico para células T Humanas (HTLV)
Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-AIDS)
Coronavírus Felino (FcoV)	SARS (Coronavirus-Síndrome Respiratória Aguda Severa)
Vírus do Sarcoma Felino (FSV)	~20 Oncogenes humanos
Influenza Aviária (H5N1)	Influenza Aviária (H5N1)
Herpesvírus felino (FHV)	Citomegalovírus (CMV- retinite)
Vírus sincicial felino (FSV)	Vírus Sincicial humano (não patogênico)
Calicivírus Felino (FCV)	Calicivírus Humano (Diarréia e vômito)
Parvovírus Felino (FPV)	Parvovírus humano B19
Morbillivírus Felino (CDV)	Morbillivírus Humano (Sarampo)

Fonte: O'BRIEN et al., 2012.

A ênfase neste estudo será dada ao vírus da imunodeficiência felina (do inglês *Feline immunodeficiency virus*- FIV) que foi isolado em 1986, de gatos domésticos com sinais de imunodeficiência, em um criatório ao norte da Califórnia (PEDERSEN et al., 1987).

### 2.2.1. A infecção pelo vírus da imunodeficiência felina

O FIV é classificado no gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e possui muitas características deste gênero, incluindo: morfologia típica, tropismo pelos linfócitos T e monócitos/macrófagos, organização genômica e infecção persistente ao longo da vida do hospedeiro (ICTV, 2012).

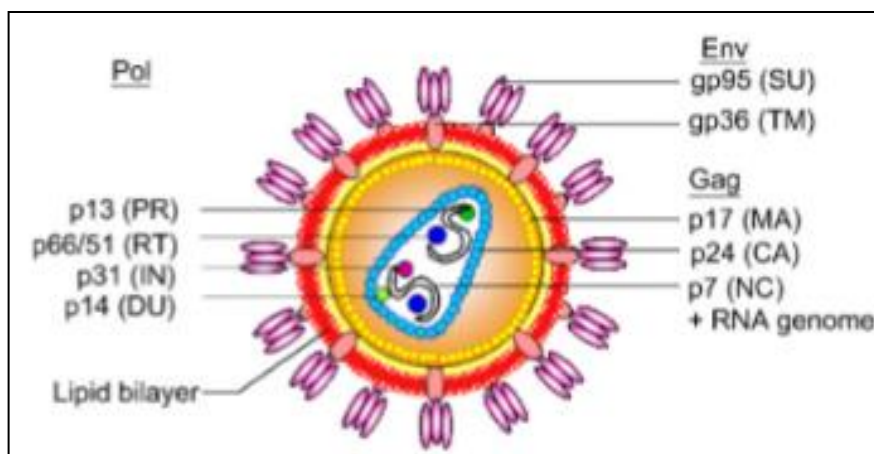
Baseado no tropismo celular e nas manifestações clínicas, os lentivírus se dividem em dois grupos. O primeiro grupo inclui os vírus que infectam linfócitos e monócitos/macrófagos e causam a síndrome da imunodeficiência. São estes os lentivírus de primatas (vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e 2 (HIV-1, HIV-2), vírus da imunodeficiência símia (SIVs), vírus da imunodeficiência bovina (BIV) e o FIV. O segundo grupo é constituído pelos vírus que, predominantemente, infectam macrófagos causando doenças imunomediadas como a artrite e encefalite caprina, vírus da anemia infecciosa equina e o vírus Maedi-Visna responsável pela pneumonia progressiva dos ovinos (O'BRIEN et al., 2012).

O FIV é capaz de infectar outras espécies felinas, além do gato doméstico (*Felis catus*), tais como o leão africano (*Panthera leo*) e a suçuarana (*Puma concolor*) entre outras 16 espécies de felinos silvestres (O'BRIEN et al., 2012).

Embora o FIV tenha sido identificado em outros felinos, a síndrome de imunodeficiência adquirida no gato doméstico é similar a do HIV, sendo por isso um importante modelo animal para o estudo do ciclo de vida, patogênica, prevenção e terapêutica dos lentivírus (BARR; PHILLIPS, 2008; HOSIE et al., 2009; DUARTE et al., 2012; SELTON; HARTMANN, 2012).

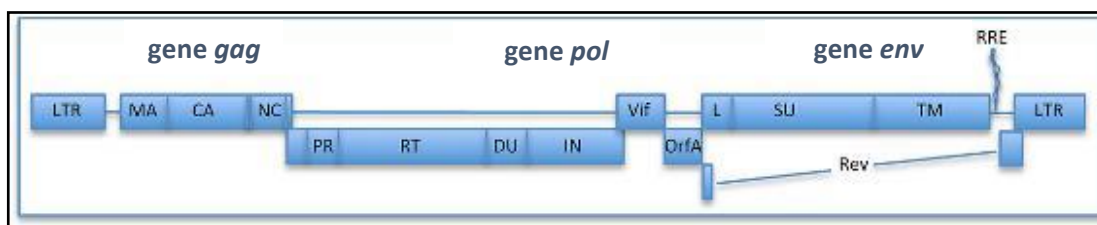
### 2.2.2. Estrutura do FIV

A morfologia e a estrutura das proteínas do FIV são típicas de um lentivírus. O virion apresenta uma forma esférica e envelopada com 105-125 nm de diâmetro, contém duas cópias de RNA de fita simples de sentido positivo, com cerca de 9400 bases nucleotídicas e, as enzimas transcriptase reversa (RT), deoxiuridina trifosfatase (dUTPase), protease e integrase, como pode ser visto na figura 3 (LECOLLINET; RICHARDISON., 2008).



**Figura 3.** Estrutura do FIV. PR, protease; RT, transcriptase reversa; IN, integrase; DU, deoxiuridina trifosfatase; SU, glicoproteína de superfície do envelope; TM, glicoproteína transmembranar do envelope; MA, matriz; CA, capsídeo e NC, nucleocapsídeo. Lecollinet e Richardson (2008).

O FIV apresenta uma organização genômica complexa, possuindo além dos genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, vários outros que codificam proteínas não estruturais e, três genes acessórios, *vif*, *ORF A* e *rev*, que codificam as proteínas envolvidas na regulação da replicação viral (BARR; PHILLIPS, 2008; DUARTE et al., 2012; O'KEEFE, 2013). Nas extremidades 5' e 3' do DNA proviral integrado ao cromossomo da célula hospedeira, encontram-se regiões repetidas denominadas “*Long Terminal Repeats*” (LTRs), que contém as informações para a iniciação e terminação da transcrição, como apresentado na figura 4 (WILLET, B., 2013).

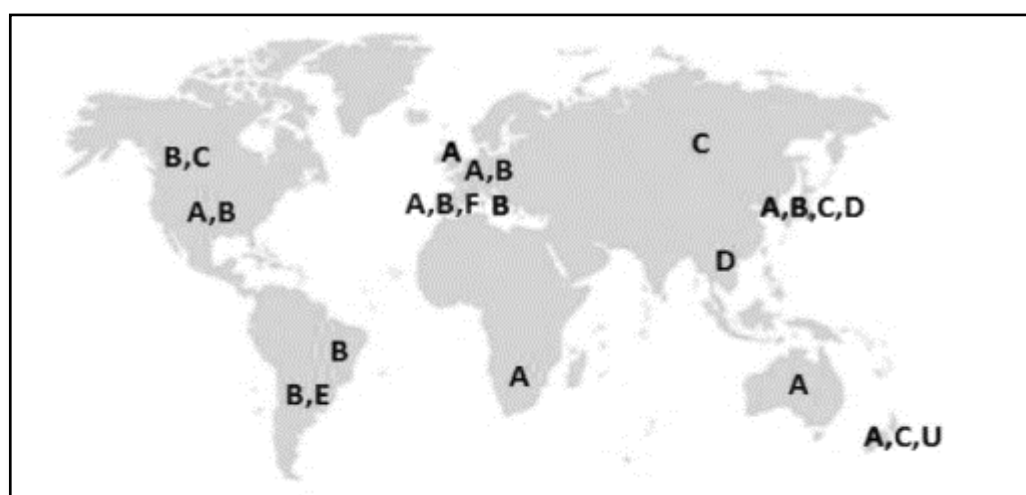


**Figura 4.** Organização do genoma do FIV. O gene *gag* (*Antígeno Grupo-específico*) codifica as proteínas que constituem a matriz (MA), o nucleocapsídeo (NC) e o capsídeo (CA). Gene *pol* codifica quatro proteínas enzimáticas, protease (PR), transcriptase reversa (RT), deoxiuridina trifosfatase (DU), e a integrase (IN). Gene *env* codifica as duas glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranar (TM). LTR: *Long terminal repeats*. Genes acessórios *vif*, *ORF-A* e *rev* codificam as proteínas envolvidas na regulação da replicação viral. Willett, B. (2013).

### 2.2.3. Epidemiologia do FIV

O FIV possui uma distribuição mundial e devido à diversidade genética, especialmente do gene *env* (região V3-V5) da gpSU, é classificado em sete subtipos: A, B, C, D, E, F e U-NZenv (HAYWARD; RODRIGO, 2010; GRACE, 2011; SELTON; HARTMANN, 2012, HOHDATSU et al., 1996; PECORARO et al., 1996; DUARTE; TAVARES, 2006; NAKAMURA et al., 2003).

A distribuição geográfica dos subtipos do FIV parece não ter um padrão determinado, sendo os subtipos A e B os mais frequentes (Figura 5). Em relação à Europa, verifica-se que o subtipo A predomina no norte-ocidental e o subtipo B no sul (STEINRIGL et al., 2010). O subtipo C é mais frequente no Japão, Ásia, Europa, Nova Zelândia e Canadá (DUARTE; TAVARES, 2006; HAYWARD et al., 2007). O subtipo D foi detectado no Japão e Vietnã (HAYWARD; RODRIGO, 2010), enquanto o subtipo E na Argentina ((HAYWARD; RODRIGO, 2010; EUROPEAN ADVISORY BOARD ON CAT DISEASES [ABCD], 2012). O subtipo U foi identificado na Nova Zelândia (HAYWARD; RODRIGO, 2010).



**Figura 5.** Distribuição global dos subtipos do FIV. HOSIE et al., 2009.

O índice de prevalência mundial do FIV é variável e depende de fatores de risco como a condição de vida do animal (GIL et al., 2013; SELTON; HARTMANN, 2012). Estudos

demonstraram a prevalência do FIV em gatos de companhia entre 4% a 12% (HAYWARD; RODRIGO, 2010; HARTMANN, 1998; LEVY et al., 2006; HARTMANN et al., 2007).

No Brasil, estudos mostram uma ocorrência variando de 1,47% a 37,5%, e, até o momento, apenas a presença do subtipo B foi encontrado (RECHE et al., 1997; CALDAS et al., 2000; CAXITO et al., 2006; LARA et al., 2008; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010).

#### **2.2.4. Transmissão do FIV**

A transmissão do FIV ocorre por mordedura por meio da saliva contaminada, e os machos de acesso livre à rua são considerados o principal reservatório do vírus, devido a serem mais propensos ao envolvimento em lutas para marcação territorial (HARTMANN, 1998).

O FIV é encontrado em maior concentração na saliva (YAMAMOTO et al., 1989) mas pode ocorrer a transmissão venérea, intrauterina e transmamária que, no entanto, são raras durante a infecção natural (O'NEIL et al., 1995; ALLISON; HOOVER, 2003). Estudos experimentais em gatos demonstram a infecção por via oral, nasal, intravaginal e intrarretal (MOENCH et al., 1993, *apud* ABCD, 2012; SELTON; HARTMANN, 2012; SYKES, 2013), assim como, pela inoculação parenteral de sangue, plasma ou soro contaminados (YAMAMOTO et al., 1989; SELTON; HARTMANN, 2012).

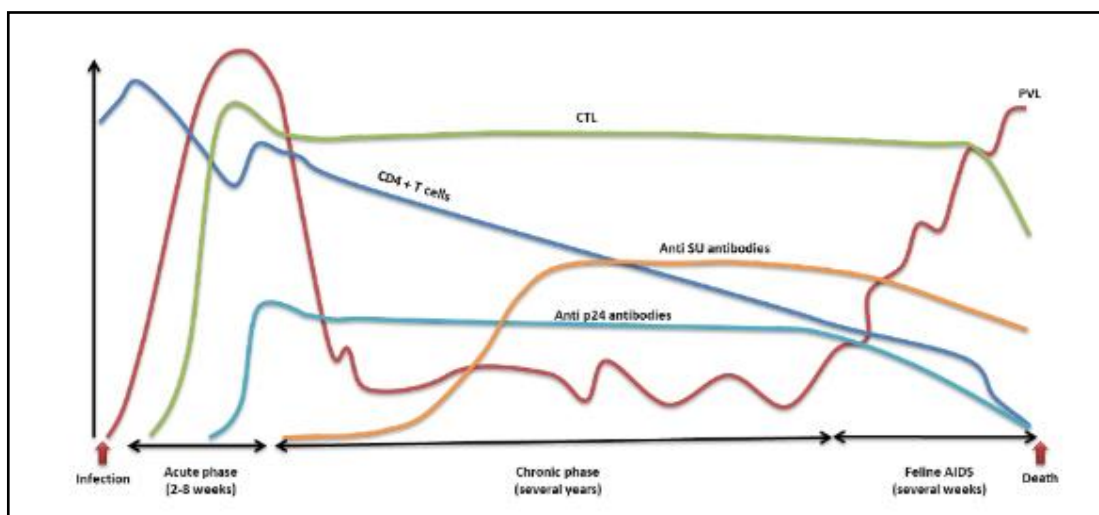
Uma vez infectado pelo FIV, o gato pode evoluir para uma imunossupressão e desempenhar um papel de reservatório para doenças como toxoplasmose e a criptosporidiose ativa, dentre outras, e dessa forma apresentar risco à saúde de outros animais e para o homem (MALIK et al., 1992).

#### **2.2.5. Patogenia da infecção pelo FIV**

As principais células-alvo para a fase inicial da infecção pelo FIV são as células T CD4<sup>+</sup> auxiliares, as células dendríticas e os macrófagos, enquanto que em fases mais avançadas da infecção, o tropismo se expande para as células T CD8<sup>+</sup> e células B (WILLETT; HOSIE, 2008), assim como, infecção das células da microglia e células estromais de medula óssea (TANABLE; YAMAMOTO, 2001).

Na infecção pelo FIV, a fase aguda é marcada por uma viremia intensa restringida pela resposta imune adaptativa em cerca de 8 semanas, podendo o vírus ser detectado no plasma (Figura 6). No período de duas a oito semanas após a infecção, os anticorpos específicos contra o FIV reconhecem as proteínas do gene *gag* (p24) e *env* (SU), enquanto ocorre uma queda na carga viral plasmática. O desenvolvimento da resposta imune celular e humoral anuncia o início da fase assintomática que pode permanecer vários anos ou prolongar-se até o fim da vida do animal. Durante este período a carga viral mantêm-se relativamente baixa, no entanto, ocorre um declínio progressivo dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Na fase terminal da infecção, ocorre imunossupressão grave, e, por consequência, diminuição dos anticorpos neutralizantes, possibilitando o aumento da carga viral, permitindo o desenvolvimento de infecções oportunistas, neoplasias ou alterações neurológicas (BĘCZKOWSKI, 2012).





**Figura 6.** Patogenia do FIV. PVL, carga viral plasmática; CTL, linfócitos T citotóxicos; SU, glicoproteína do Env; p24, proteína do capsídeo viral. Bęczkowski (2012).

O potencial patogênico de FIV tem sido demonstrado em estudos epidemiológicos e clínicos, bem como em infecções experimentais (HOSIE et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1988). No entanto, o alcance e a gravidade da infecção pelo FIV são difíceis de prever e depende de vários fatores, incluindo, a idade e estado de saúde do gato, bem como a carga e a cepa viral no momento da infecção (HARTMANN, 2011; DIEHL; HOOVER, 1995).

### 2.2.6. Diagnóstico da infecção pelo FIV

A detecção do vírus no plasma ou em linfócitos de sangue periférico de animais infectados, utilizando o isolamento em cultura de células, é possível ao longo de todo o período da infecção, mas inexecutável como diagnóstico de rotina, pela lentidão, de pelo menos duas semanas, na confirmação do resultado, e custo elevado (PEDERSEN; BARLOUGH, 1991; HARTMANN, 1998; HOSIE et al., 2009).

A detecção do DNA proviral do FIV pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada altamente sensível e específica e pode ser utilizada para tecidos, baço, medula óssea e leucócitos (BIENZLE et al., 2004). Contudo, devido à ampla variabilidade genética comum aos lentivírus, alguns estudos demonstram resultados variáveis, sendo necessário estudos prévios do subtipo circulante na região (CRAWFORD et al., 2005).

Os anticorpos contra o FIV podem ser detectados por ELISA, *Western Blot*, IFA (imunofluorescência indireta) e imunocromatografia. No entanto, os testes atuais não distinguem os anticorpos que resultaram da infecção natural, da obtida por vacinação, ou adquiridos pelo colostro (HARTMANN et al., 2007; EUROPEAN ADVISORY BOARD ON CAT DISEASES ABCD, 2012).

O *Western Blot* é considerado padrão-ouro pela sua alta especificidade e é utilizado como teste confirmatório de resultados inconclusivos para o diagnóstico da infecção pelo FIV (PEDERSEN; BARLOUGH, 1991; HOSIE et al., 2009). Entretanto, o ELISA é a técnica mais amplamente utilizada para o diagnóstico de rotina por apresentar uma sensibilidade de 98,3% e uma especificidade de 100% (COURCHAMP et al., 1998; LEVY et al., 2006; SYKES, 2013).

Hartmann e colaboradores (2007) publicaram um estudo comparativo sobre a qualidade dos sete testes disponíveis comercialmente para o diagnóstico do FIV. Três destes sistemas baseiam-se no princípio do ELISA (SNAP Combo Plus<sup>®</sup>, Virachek<sup>®</sup> e PetChek

Plus<sup>®</sup>) e quatro no princípio da imunocromatografia (Witness<sup>®</sup>, Mapic<sup>®</sup>, FASTest<sup>®</sup>, DUO Speed<sup>®</sup>). Foram analisadas 536 amostras de soro de gatos obtidas de forma randômica e a presença de anticorpos contra o FIV foi confirmado por *Western Blot* nas amostras positivas em, pelo menos, um dos testes. A presença de anticorpos contra o FIV foi confirmada por *Western Blot* em 55 das 536 amostras (prevalência de 10,3%). O teste Mapic<sup>®</sup> foi excluído por apresentar cerca de 23,1% dos resultados inválidos e 11,1% dificuldade na interpretação. Os outros testes apresentaram a sensibilidade entre 92,1 a 100% e a especificidade de 98,9 a 100%, os valores preditivos positivos e negativos variaram de 91,2 a 100% e 99,2 a 100%, respectivamente. Segundo o autor, os testes que apresentaram o melhor desempenho foram: SNAP Combo Plus<sup>®</sup>, FASTest<sup>®</sup> e DUO Speed<sup>®</sup>. Segundo os autores, o teste mais recomendado para uso no diagnóstico foi o SNAP Combo Plus<sup>®</sup> por ter obtido o melhor desempenho, dentre os testes avaliados, com sensibilidade de 100% e especificidade 99,6%, seguido pelos testes FASTest<sup>®</sup> e DUO Speed<sup>®</sup>.

O quadro 6 apresenta as empresas fornecedoras, a plataforma tecnológica empregada, os antígenos utilizados e as amostras que podem ser utilizadas nos testes avaliados por Hartmann e colaboradores (2007).

**Tabela 6.** Comparação de sete testes comerciais para a detecção de anticorpos contra o FIV.

<b>Produto</b>	<b>Empresa</b>	<b>Plataforma</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Amostra</b>
SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV Combo Plus	IDEXX Laboratories Inc.	ELISA	gp40 e p24	ST, P, S
PetChek Plus <sup>®</sup>	IDEXX Laboratories Inc.	ELISA	gp40 e p24	P, S
Viracheck <sup>®</sup>	Synbiotics Corporation	ELISA	gp40	ST, P, S
Witness <sup>®</sup>	AGEN Biomedical Limited	Imunocromatografia	gp40	ST, P, S
Mapic <sup>®</sup>	Sinovus Biotech Inc.	Imunocromatografia	gp40	ST, P, S
FASTest <sup>®</sup>	Megacor	Imunocromatografia	gp40	ST, P, S
DUO Speed <sup>®</sup>	BIO VET TEST (BVT)	Imunocromatografia	gp40	ST, P, S

(ST- sangue total; P- plasma; S- soro; gp40- Glicoproteína; p- proteína). Fonte: A autoria própria

### 2.3. Desenvolvimento e Validação de um Teste para Uso Veterinário

Medeiros (2004) descreveram que o desenvolvimento de um novo reagente para diagnóstico, desde a concepção da ideia até o seu registro, perpassa por diferentes fases. Após a descoberta científica de um determinado agente, a primeira fase é o pré-desenvolvimento, onde são realizadas a caracterização do antígeno, do anticorpo e a seleção e definição de métodos diagnósticos. A fase seguinte é de desenvolvimento, onde deve ser realizada em laboratórios específicos, dotados de instalações validadas, equipamentos calibrados e mediante o uso de insumos certificados e devem ser adotados os requisitos de Boas Práticas de Laboratórios (BPL). Dentre as atividades específicas desta fase destacam-se o estabelecimento do lote semente, o escalonamento e a consistência da produção, a estabilidade e a determinação da viabilidade econômica e tecnológica de produção. A última fase antes do processo produtivo é a validação do produto, onde são avaliadas e validadas, de forma ampliada, as principais características básicas do produto, ou seja, a sensibilidade, a especificidade, a repetibilidade e estabilidade, características estas que deverão ser testadas

frente a um painel de sensibilidade ou padrão de referência. O processo de produção deve atender às normas de BPF- instalações adequadas e validadas, evitando cruzamento de fluxos de pessoal e materiais, equipamentos calibrados, validados e dedicados por linha de produção, insumos certificados, documentação do processo produtivo lote a lote (dossiês de produção), uso de procedimentos operacionais padronizados (POP) em todas as atividades relacionadas à produção, pessoal qualificado e permanentemente submetido a treinamentos entre outras. Os lotes de produção deverão ser submetidos a testes de controle de qualidade pelo produtor, por profissionais e em instalações independentes daquelas encontradas na área de produção e pela referida autoridade regulatória.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor. Sendo assim, compete ao MAPA baixar normas complementares referentes à fabricação, ao controle de qualidade, à comercialização e ao emprego dos produtos de uso veterinário, inclusive as aprovadas no âmbito do Mercosul. O MAPA é organizado em secretarias, e em 2012, foi publicada pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) uma compilação da legislação relacionada aos produtos de uso veterinário, constando a Instrução Normativa SDA nº 4, de 19 de fevereiro de 2008, que aprova as Normas Técnicas para a fiscalização da produção, controle, comercialização, modo de utilização de produtos de uso veterinário destinado a diagnosticar doenças dos animais (MAPA, 2008). Em novembro de 2013, com o objetivo de oferecer orientações para a padronização e aprimoramento da qualidade relacionadas a saúde animal, foi publicado o Manual do Sistema Nacional de Informação Zoossanitária-SIZ deliberando que: “O padrão de referência considerado para os testes diagnósticos é o Manual de Testes de Diagnóstico e de Vacinas para os Animais Terrestres, da Organização Mundial de Saúde Animal” (MAPA, 2013).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA ou OIE) é uma organização intergovernamental com sede em Paris, que sucedeu, em 2003, a antiga Organização Internacional das Epizootias (OIE), que havia sido criada em janeiro de 1924. O objetivo principal é coordenar e incentivar, a informação, a investigação e a elaboração de normas sanitárias para o controle de epizootias. A OIE, atualmente, conta com 180 países engajados na promoção da saúde e bem-estar animal em todo o mundo (OIE, 2016).

Durante a 71ª Sessão Geral da OIE, em maio de 2003, o Comitê Internacional aprovou a Resolução Nº XXIX/2003, onde consta os princípios de validação e certificação de ensaios diagnósticos (métodos de ensaio) para doenças infecciosas de animais. Em 2014, baseados nesta Resolução, foi elaborado o Manual de Testes para Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres contendo os procedimentos padrões específicos para a validação e certificação de testes diagnósticos para doenças infecciosas dos animais (OIE, 2016).

No Brasil, o MAPA aprovou a Instrução Normativa Nº 13, de 03.10.03 que estabelece o Regulamento de BPF de Uso Veterinário de acordo com a legislação vigente da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV), considerando a necessidade de dispor de instrumento de avaliação das condições de fabricação e garantia de qualidade dos produtos de uso veterinário e, considerando, ainda, a importância de ser compatibilizada a legislação nacional aos regulamentos referente às Boas Práticas de Fabricação no âmbito do Mercosul (MAPA, 2003).

O MAPA define BPF como sendo a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido. Por sua vez, Garantia da Qualidade é a totalidade das providências tomadas com o objetivo de garantir que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para que possam ser utilizados para os fins aos quais tenham sido propostos. Estes conceitos estão inter-relacionados e enfatizam a importância na produção e

no controle de produtos veterinários. Dentro dos requisitos de BPF, a validação é uma etapa importante, pois tem por objetivos, dentre outros: ação documentada, de provar, que um procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema, conduz efetivamente aos resultados esperados.

O conceito de validação está em contínua evolução. Wright et al. (1993) interpretaram a validação como o desempenho do novo teste comparado ao em uso de rotina. Jacobson (1998) define que um ensaio validado consistentemente fornece os resultados dos testes capazes de identificar animais como sendo positivo ou negativo para um analito ou processo (por exemplo, um anticorpo ou o antígeno) e, por inferência, prevê com precisão o estado da infecção dos animais com um predeterminado grau de certeza estatística. Greiner e Gardner (2000) referem-se à validação como um processo contínuo e a análise do método deve ser planejada de acordo com a estrutura dos dados.

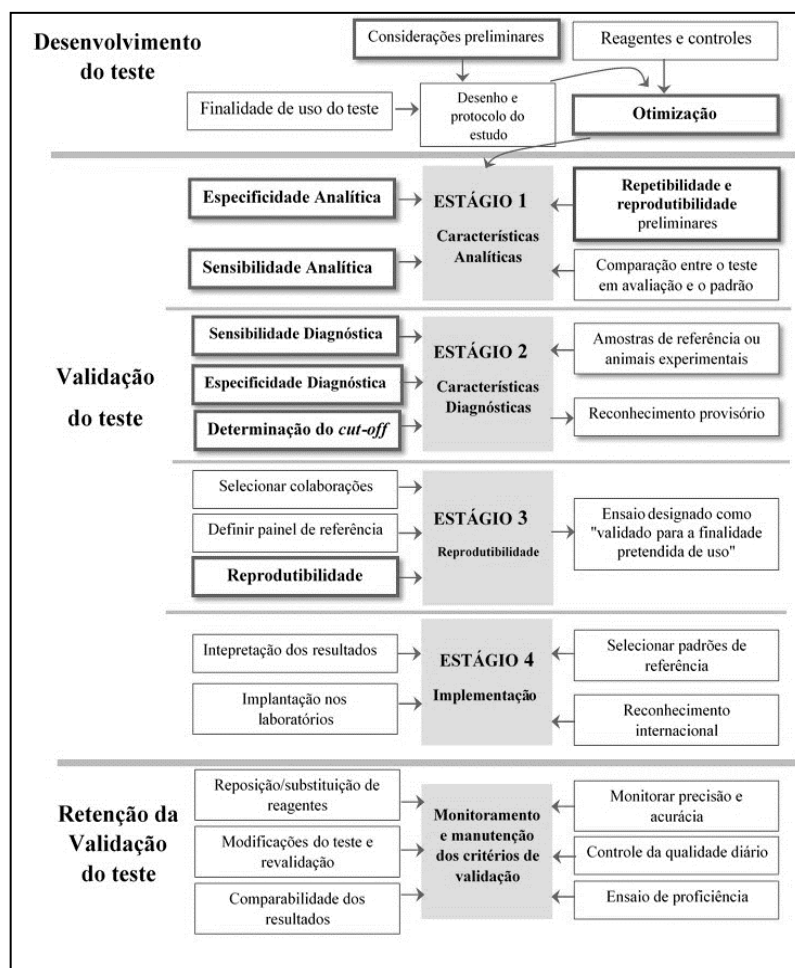
O MAPA define como validação de determinado procedimento analítico sendo um estudo experimental e integralmente documentado que objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões (MAPA,2003).

A OIE (2016 b) define validação como um processo que determina o desempenho do ensaio, o qual foi devidamente desenvolvido, otimizado e padronizado, de atender a finalidade pretendida.

Com um repertório crescente de novos reagentes para diagnóstico e novas plataformas tecnológicas faz-se necessário a harmonização de procedimentos do processo de validação com o estabelecimento de critérios durante o desenvolvimento e validação dos diferentes tipos de ensaios.

Segundo a OIE, o processo de validação de testes diagnósticos engloba onze critérios, a saber: a proposta de uso, a otimização, a padronização, a repetibilidade, a sensibilidade analítica, a especificidade analítica, o ponto de corte, a sensibilidade diagnóstica, a especificidade diagnóstica, a reprodutibilidade e adequação à finalidade da proposta de uso (2016 b).

As fases do processo de validação de um teste diagnóstico para uso veterinário recomendado pela OIE (2016 b) iniciando pelo desenvolvimento, validação e o monitoramento e manutenção dos critérios de validação encontram-se na Figura 7.



**Figura 7.** Fases do processo de desenvolvimento e validação de um teste diagnóstico para uso veterinário. Os critérios de validação em negrito e sombreado. Adaptado da OIE (2016 b).

### 2.3.1. Primeira etapa do processo de validação

A primeira etapa do processo de validação de um ensaio é o desenvolvimento de um teste englobando a finalidade de uso do teste, desenho do estudo, seleção de amostras controle e referência, e otimização.

As propostas de uso mais frequentes para métodos de diagnóstico de doenças dos animais são:

- Demonstrar a ausência da infecção em uma população definida, com ou sem vacinação; certificar qualquer possibilidade de infecção ou presença do agente em cada animal ou produtos para fins comerciais;
- Avaliar a erradicação da doença ou a eliminação da infecção a partir de populações definidas; confirmar o diagnóstico de casos clínicos ou suspeitos;
- Estimar a prevalência da infecção ou exposição para facilitar a análise de risco (inquéritos, implementação de medidas de controle de doenças);
- Determinar o estado imunológico dos animais individuais ou populações (pós-vacinação).

A espécie animal alvo, o patógeno, a seleção de amostras controles e de referência, os reagentes, e o formato definido compõem o desenho do teste. Os experimentos iniciais são realizados para determinar se a proposta do teste é viável evidenciando na prática os

resultados de uma proposição teórica. O uso de um painel de referência deve ser testado no teste protótipo, e a esta etapa é denominada de prova de conceito. As amostras de referência são usadas nos experimentos realizados durante o processo de desenvolvimento e também são empregadas na validação do ensaio.

O processo de trabalho intensivo de otimização de um ensaio é fundamental para alcançar um desempenho confiável e esperado do ensaio. Segundo a OIE (2016 b), otimização é o processo por meio do qual os parâmetros físicos, químicos e biológicos mais importantes de um teste são avaliados e ajustados de modo a assegurar que as características de desempenho do ensaio sejam mais adequadas para a aplicação pretendida. Durante a otimização de um ensaio, é importante registrar todas as etapas dos processos e os parâmetros do ensaio, uma vez que estes são pontos críticos que podem afetar a confiabilidade do ensaio. O controle de equipamentos e materiais, diluições e faixa de pH do teste são exemplos de parâmetros que fazem parte da otimização do ensaio.

O desenvolvimento de um teste também deve ser acompanhado por outro parâmetro, a robustez, que por definição é a capacidade do ensaio permanecer inalterado durante variações operacionais que podem ocorrer na execução do teste em um único laboratório. Os fatores mais suscetíveis que afetam a robustez do ensaio incluem o pH, temperatura dos reagentes ou fatores aquosos ou orgânicos da matriz (OIE, 2016 b).

### 2.3.2. Segunda etapa do processo de validação

A segunda etapa do processo de validação de um ensaio avalia o desempenho do ensaio e abrange quatro estágios, a saber:

- Estágio 1 - Características Analíticas;
- Estágio 2 - Características Diagnósticas;
- Estágio 3 - Reprodutibilidade;
- Estágio 4 - Implementação do teste.

No estágio 1 são avaliadas as características analíticas estimadas pelos valores de sensibilidade analítica e especificidade analítica.

A sensibilidade analítica é a menor quantidade de uma amostra que um determinado *kit*, antígeno ou anticorpo pode detectar, quando utilizada uma determinada técnica (prova) (MAPA, 2008).

A especificidade analítica é o grau no qual as amostras analisadas, distinta da amostra problema reagem, quando utilizado em um determinado *kit*, antígeno ou anticorpo para a realização de uma determinada técnica (prova) (MAPA, 2008). Para a OIE (2016 b) é o grau em que o ensaio distingue entre o analito alvo e outros componentes que podem ser detectados (ex: interferentes, produtos de degradação, ligação inespecífica à fase sólida), capaz de causar respostas falsamente reduzidas ou elevadas no teste afetando a especificidade analítica.

A repetibilidade é o nível de concordância entre os resultados de réplicas de uma amostra que foram testadas pelo mesmo *kit*, antígeno ou anticorpo, quando utilizada uma mesma técnica (prova) diferentes vezes dentro do mesmo laboratório (MAPA, 2008).

No estágio 2 são avaliadas as características diagnósticas do ensaio estimadas pela sensibilidade e a especificidade diagnóstica e o valor de ponto de corte (*cut-off*).

A sensibilidade diagnóstica é a capacidade que um determinado *kit*, antígeno ou anticorpo possui para identificar corretamente amostras de animais sabidamente positivos em um grupo de animais, quando utilizada uma determinada técnica (prova) (MAPA, 2008).

A especificidade diagnóstica é a capacidade que um determinado *kit*, antígeno ou anticorpo possui para identificar corretamente amostras de animais sabidamente negativos em um grupo de animais, quando utilizada uma determinada técnica (prova) (MAPA, 2008).

O ponto de corte é o valor selecionado para distinguir entre resultados positivos e negativos em uma escala contínua de valores e deve refletir a finalidade do ensaio e sua aplicação (OIE, 2016 b). Ponto de corte são usados para diferenciar doença de saúde ou para diferenciar doenças apresentando sinais semelhantes.

As características de sensibilidade e especificidade diagnóstica são estimadas a partir da definição do ponto de corte e consequente diferenciação das amostras positivas e negativas.

No estágio 3 é avaliado a reprodutibilidade do ensaio. A reprodutibilidade é a capacidade de um método proporcionar resultados consistentes, tal como determinado pelas estimativas de precisão, quando aplicado a alíquotas de uma mesma amostra testada em diferentes laboratórios, de preferência localizado em regiões distintas ou diferentes países (OIE, 2016 b).

O estágio 4 fornece evidências adicionais e valiosas para o êxito na implementação do ensaio de acordo com as expectativas.

A interpretação dos resultados deve considerar a determinação dos valores preditivos positivo e negativo que são dependentes da sensibilidade, da especificidade do teste e da prevalência de uma determinada enfermidade na população.

O valor preditivo positivo é a probabilidade de um animal com um resultado de teste positivo que efetivamente têm a doença.

O valor preditivo negativo é a probabilidade de um animal com um resultado de teste negativo que efetivamente não têm a doença.

As relações entre estas variáveis são:

- Quanto maior a sensibilidade, maior será o valor preditivo negativo, isto é, maior será a probabilidade de, perante um resultado negativo, não haver doença.
- Quanto maior a especificidade, maior será o valor preditivo positivo, isto é, maior será a probabilidade de, perante um resultado positivo, haver doença.
- Quanto maior a prevalência da doença, maior será o valor preditivo positivo e menor será o valor preditivo negativo, isto é, quanto mais frequente é uma doença mais provável é encontrar verdadeiros positivos (aumentando o valor preditivo positivo), mas também é mais provável encontrar falsos negativos (diminuindo o valor preditivo negativo).

### **2.3.3. Terceira etapa do processo de validação**

A terceira etapa no processo de validação de um ensaio consiste no monitoramento e a manutenção dos critérios de validação aplicado ao teste em campo. Para um ensaio manter o estado de validação do método de ensaio para uma finalidade específica é necessário um constante monitoramento para verificar a manutenção do seu desempenho conforme definido durante a validação do teste. Isto pode ser determinado em um programa de garantia da qualidade através da monitorização criteriosa do ensaio com o desempenho diário, principalmente, por meio das estimativas de acurácia e precisão (OIE, 2016 b).

A avaliação do valor de uma estimativa qualquer depende de uma verificação da capacidade dessa avaliação de se direcionar especificamente ao objetivo desejado e, apresentar uma margem de erro pequena. No contexto de testes diagnósticos, a proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos, em relação à totalidade, é definida como acurácia, e de apresentar uma pequena margem de erro é definido como precisão.

As modificações nos protocolos de produção requerem uma nova avaliação, para confirmar o desempenho do teste. A diminuição na prevalência da doença alterações sazonais, ou mudanças nas práticas de vacinação podem gerar a necessidade de revalidação do teste segundo o seu propósito de uso (OIE, 2016 b).

O ensaio de proficiência é utilizado para avaliar o desempenho do teste e do laboratório, comparando-o com os de mesma natureza e/ou com o desempenho de laboratórios de referência. O desempenho insatisfatório do ensaio de proficiência pode evidenciar inadequação na manipulação de amostras ou em processos (OIE, 2016 b).

É importante salientar que outros fatores podem afetar a utilização à qual se destina o ensaio. A aceitação do cliente, a incapacidade de atender aos requisitos operacionais para execução do teste, a concordância por parte da comunidade científica e o cumprimento de requisitos legais, também pode tornar o ensaio muitas vezes impróprio para o uso pretendido (OIE, 2016 b).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento do Estudo

Os experimentos deste trabalho foram realizados nos Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) e no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), pertencentes ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, e no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária (LIVV) do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Basicamente, este estudo foi desenvolvido em cinco etapas (Tabela 7): **(i)** levantamento de informações dos órgãos oficiais contendo as diretrizes para a validação de ensaios laboratoriais destinados ao diagnóstico de doenças de animais; **(ii)** estabelecimento da produção, purificação e caracterização físico-química da proteína recombinante p-24 do FIV; **(iii)** obtenção das amostras de sangue de gatos de proprietários particulares e de abrigos localizados na cidade do Rio de Janeiro. Estas amostras possibilitaram o isolamento e a produção da IgG de gato, usada como inóculo em galinhas poedeiras, para o isolamento da IgY anti-IgG de gato e posterior conjugação à peroxidase; **(iv)** emprego da tecnologia de IgY no desenvolvimento, padronização e a validação do teste de ELISA r-p24 IgY para o diagnóstico da FIV; **(v)** comparação do teste ELISA r-p24 IgY desenvolvido neste estudo frente ao teste ELISA r-p24 IgG que utiliza a anti-IgG de gato ligada à peroxidase produzida em mamíferos para o diagnóstico da FIV.

**Tabela 7.** Organização das etapas do delineamento do estudo.

<b>1ª Etapa</b>	
I.	Levantamento de informações dos órgãos oficiais com diretrizes para a validação de ensaios para o diagnóstico de doenças de animais.
II.	Análise de critérios e procedimentos para validação: finalidade de uso do teste; otimização; padronização; repetibilidade; sensibilidade analítica e diagnóstica; ponto de corte; reprodutibilidade; adequação a finalidade de uso.
<b>2ª Etapa</b>	
I.	Estabelecimento da produção, purificação e caracterização físico-química da proteína recombinante p-24 do FIV.
II.	Obtenção da biomassa.
III.	Produção da proteína r-p24.
IV.	Purificação da proteína r-p24.
V.	Análise da homogeneidade por SDS-PAGE.
VI.	Análise da pureza e especificidade por <i>Western Blot</i> .
<b>3ª Etapa</b>	
I.	Obtenção das amostras de sangue de gatos de proprietários particulares e de abrigos localizados na cidade do Rio de Janeiro.
II.	Produção de anticorpos IgY anti-IgG de gato.
III.	Coleta de amostras de sangue de gatos.
IV.	Obtenção e purificação da IgG de gato.

Continua...

## Continuação da Tabela 7.

4ª Etapa	
I.	Aplicação da tecnologia de IgY no desenvolvimento, padronização e a validação do teste de ELISA r-p24 IgY.
II.	Desenvolvimento do ELISA r-p24 IgY.
III.	Preparo das amostras de referência.
IV.	Preparo da IgY anti-IgG de gato conjugada à peroxidase.
V.	Padronização do Elisa r-p24 IgY empregando as amostras de referência.
VI.	Estabelecimento do ponto de corte.
VII.	Validação do <i>kit</i> de Elisa r-p24 IgY.
VIII.	Sensibilidade, especificidade, repetitividade, precisão intermediária.
IX.	Estudo de estabilidade do <i>kit</i> de Elisa r-p24 IgY.

5ª Etapa	
I.	Comparação do ELISA r-p24 IgY frente ao ELISA r-p24 IgG.

### 3.2. Análise de Critérios e Procedimentos para Validação do Teste Desenvolvido

As diretrizes para o desenvolvimento deste trabalho foram pautadas nos levantamentos de informações disponibilizadas pela internet por órgãos governamentais, contendo as principais normas nacionais e internacionais para a validação dos ensaios de diagnóstico de doenças dos animais. O material de estudo consistiu de documentações descritas no Manual de Testes para Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres redigido pela OIE, e, a Instrução Normativa N°13, do MAPA (2008). Foram utilizados também revistas científicas, livros, além de consulta a pessoas e órgãos de saúde animal.

### 3.3. Produção da Proteína Recombinante r-p24

O plasmídeo recombinante foi obtido a partir do DNA genômico de um gato naturalmente infectado pelo FIV que foi extraído de suas células mononucleares do sangue periférico. Os oligonucleotídeos foram sintetizados baseados na região alvo da proteína p24 da sequência nucleotídica do genoma do FIV subtipo B. Como vetor de expressão foi adotado o Champion peT101 Directional TOPO. A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa BL21star foi utilizada para a obtenção de células competentes, e os clones transformantes foram analisados em gel de agarose (MAZUR et al., 2010).

#### 3.3.1. Obtenção da biomassa

Este trabalho foi iniciado com a produção da biomassa do plasmídeo recombinante contendo a proteína r-p24 seguindo o protocolo sugerido por Mazur et al. (2010). As células competentes de *E. coli* cepa BL 21star e o pré-inóculo (DNA plasmidial- uma colônia isolada em meio LB com ampicilina 200 mg/ml) foram incubadas a 37°C, sob agitação de 200 xg durante 16 h. A cultura foi transferida para frascos de 1000 mL até atingir a absorbância de 0,6 a 0,8 a 600 nm, e em seguida, foi adicionado IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopiranosídeo) 1M e incubado a 37°C, sob agitação de 200 xg durante 4 h. Após a centrifugação a 4000 xg por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido a -80°C, até a purificação.

### 3.3.2. Purificação da proteína r-p24

O precipitado foi adicionado a solução tampão de lise (Fosfato de sódio 20mM, NaCl 0,5M, Imidazol 20mM, pH 7,2), acrescentando-se 5 mL desta solução para cada grama de *pellet*. Em seguida, adicionou-se Triton X-100 na concentração final de 0,1% e submetido a banhos de ultrassom com 12 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo e mantidos a 4°C, por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 12 000 xg por 40 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade por níquel em coluna HisTrap™ 5mL crude FF (GE Healthcare Life Science) acoplada ao Sistema de Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) Akta Purifier 10 (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com solução tampão de fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5M, Imidazol 20 mM, pH 7,2 (Eluente A) e a eluição da proteína recombinante foi realizada com solução tampão de fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM, pH 7,2 (Eluente B). Foram coletadas frações de 5 mL e a corrida foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm. As frações com picos foram reunidas, concentradas e dialisadas em Amicon Ultra 3K (Millipore) e a quantificação da proteína foi estimada pelo método Folin-Lowry utilizando o kit da Bio-Rad DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

### 3.3.3. Análise da homogeneidade da proteína r-p24 por SDS-PAGE

A homogeneidade da proteína recombinante r-p24 foi analisada por SDS-PAGE gradiente em condições redutoras e não redutoras utilizando gel de poli(acrilamida) Phastgel gradient 8-25% (GE Healthcare). As amostras foram incubadas com solução tampão contendo Tris-HCl 60mM, SDS 2%, glicerol 25% e azul de bromofenol 0,1%, pH 6,8 (com ou sem o agente redutor DTT 0,2M). Para a estimativa de peso molecular (PM), foram utilizados os padrões proteicos *Precision Dual Color* (Bio-Rad) cujos valores de PM estão compreendidos entre 10.000 - 250.000. A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem® (GE Healthcare) com corrente constante de 10 mA, voltagem de 250 V e duração de 30 minutos. O gel foi revelado com solução aquosa do corante de Coomassie Brilliant Blue R350 (PhastGel Blue R, GE Healthcare) 0,1% em metanol 30% e ácido acético 10%. Após 1 hora de incubação com o corante à temperatura ambiente, o gel foi descorado por meio de lavagens sucessivas com solução aquosa de metanol 30% e ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi digitalizado e a imagem obtida foi analisada no programa GelDoc XR+ (Bio-Rad).

### 3.3.4. Análise da pureza e especificidade da proteína r-p24 por *Western Blot*

A proteína r-p24 purificada foi submetida à técnica de *Western Blot* para verificação da pureza e especificidade. Após o SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) foi realizada a transferência em membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento de transferência Trans-Blot SD Semi-dry Transfer cell (BioRad), conforme recomendação do fabricante. Em seguida, a eficiência da transferência foi checada pela coloração da membrana com solução de Ponceau S (0,1% Ponceau S e 5% ácido acético glacial) por 10 min e descorada com água deionizada Milli-Q®. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras de 3mm e os sítios reativos remanescentes foram bloqueados por 16 h com solução tampão Tris-HCl contendo 5% de leite em pó desnatado. As tiras foram lavadas 3 vezes com PBST sob agitação e foi acrescentado, individualmente, os soros de gatos positivo e negativo para FIV diluídos 1/100 e incubadas por 2 h a 37°C sob agitação. Em seguida, as tiras foram lavadas novamente 3 vezes com PBST e foi adicionado o conjugado produzido em coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase (HRP Sigma, 25.000 unidades, Tipo VI), diluído 1/2 000 e incubado por 1h a 37°C sob agitação. Após 3 lavagens com PBST, foi adicionada a

solução de substrato-cromógeno contendo peróxido de hidrogênio a 30% e 3,3' Diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) em PBS pH 7,2. As bandas foram visualizadas após 10-15 min de incubação sob agitação suave, e a reação enzimática foi então bloqueada com água deionizada Milli-Q®.

### **3.4. Produção de Anticorpos IgY anti-IgG de Gato**

Todos os experimentos envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-IV da UFRRJ, protocolos sob os números 018/2014 e 0572014.

#### **3.4.1. Coleta de amostras de sangue de gatos**

Os ensaios iniciais foram realizados com amostras de soro de gatos sabidamente positivos e negativos para o FIV, previamente armazenados a -20°C, e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária/UFRRJ. Entretanto, foi necessário a obtenção de novas amostras para serem utilizadas no desenvolvimento e padronização do ELISA r-p24 IgY. Desta forma, as novas amostras de sangue foram coletadas de gatos adultos provenientes de proprietários particulares e abrigos localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro, sem distinção de raça ou sexo, no período de novembro de 2014 a abril de 2016. Os proprietários dos animais que participaram da pesquisa assinaram o termo de consentimento para a coleta de sangue dos seus animais. Cerca de 2,0 ml de sangue foram colhidos dos animais por meio de punção da veia cefálica/femural em tubos contendo anticoagulante (EDTA 8%). O sangue foi transportado acondicionado em caixa de transporte para o laboratório. O plasma foi obtido através de centrifugação a 2.000 xg por 10 minutos e armazenados a -20°C até o momento do uso.

#### **3.4.2. Obtenção e purificação da IgG de gato**

A IgG de gato foi obtida a partir de um *pool* de três amostras de gatos saudáveis e negativas para FIV quando avaliados no teste comercial SNAP® FIV/FeLV Combo (IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, EUA)). A fração globulínica da amostra de soro foi precipitada com sulfato de amônia (a primeira precipitação na concentração final de 35%, seguida de duas precipitações na concentração final de 30%), conforme descrito por Jones et al. (1978). Entre as precipitações, o material foi centrifugado a 10000 xg por 20 minutos e o precipitado final foi dissolvido em solução Tris HCl 20 mM, pH 8,0. A amostra foi dessalinizada em coluna HiTrap Desalting 5 mL (GE Healthcare) e a eluição foi acompanhada por medida de absorção a 220 nm e 280 nm. As frações que apresentaram maiores concentrações foram reunidas e purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF 1 mL (GE Healthcare). A eluição da amostra foi feita em gradiente de 20% a 100% da solução de Tris-HCl 20 mM, NaCl 1M, pH 8,0, e foi acompanhada por medida de absorção a 220 nm e 280 nm. As frações com maiores concentrações foram reunidas e concentradas em Amicon 3 KDa (Millipore, Massachusetts, EUA). A quantificação da proteína IgG foi estimada pela leitura espectrofotométrica a 280nm utilizando-se o coeficiente de extinção 1.4 para IgG de gato (JONES et al., 1978).

A análise da homogeneidade da IgG de gato purificada foi realizada por SDS-PAGE Phastgel gradient 8-25 (PhastSystem, GE Healthcare), conforme descrito no item 4.3.3.

### 3.4.3. Desenho experimental para a obtenção da IgY

Foram utilizadas duas galinhas de postura da linhagem comercial Hy-line, com 22 semanas de idade, e mantidas no Biotério de Experimentação Animal do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária (LIVV), Instituto de Veterinária da UFRRJ, em gaiolas individuais de postura, com água *ad libitum*. A ração fornecida às aves foi balanceada, de acordo com as necessidades nutricionais padronizadas, conforme especificação da Dra. Cristina Amorim Ribeiro de Lima, do Departamento de Nutrição Animal do Instituto de Zootecnia, UFRRJ.

A primeira imunização das aves foi realizada pela injeção de 500 µL de uma emulsão contendo 250 µg de IgG de gato com adjuvante de Freund Completo (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-EUA). Os três reforços subsequentes foram realizados com a mesma concentração utilizando adjuvante de Freund Incompleto. O inóculo foi administrado via intramuscular no músculo peitoral das galinhas nos dias 0, 15, 30 e 66.

### 3.4.4. Monitoramento da produção de IgY

A análise da reatividade dos anticorpos IgY anti-IgG de gato, obtida a partir da precipitação com PEG 6000 foram avaliados por ELISA. A titulação cruzada foi empregada, primeiramente, para estabelecer as condições de uso ideais dos insumos (captura, diluição das amostras e conjugado). Foram utilizadas diferentes concentrações de captura IgG de gato (1 a 20 µg/mL), de amostras IgY (1:250 a 1:2000) e do anticorpo de cabra anti-IgY conjugada a peroxidase (1:2000, 1:4000, 1:16000, 1:32000). Após a definição das condições ideais, as microplacas de poliestireno com 96 poços (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Dinamarca) foram sensibilizadas com IgG de gato purificado (10 µg/mL) diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 35 mM NaHCO<sub>3</sub>). Após 2h a 37°C, as placas foram lavadas (4x) com uma solução PBST 0,05% e foram adicionados 100 µL/poço da amostra de IgY diluídas 1:1000 em tampão de amostra [PBST 0,05% pH 7,6 [9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] com 10% (p/v) de leite em pó desnatado Molico (Molico<sup>®</sup>, Nestlé, BR), 0,05% Tween 20]. Após 30 minutos de incubação a 37°C, as placas foram lavadas (4x) com uma solução 0,05% PBST e foram adicionados 100 µL de anticorpo de cabra anti-IgY conjugada a peroxidase (Promega Corporation, EUA) na diluição 1:16000 em 0,05% PBST e 1% BSA (InLab<sup>®</sup>, BR). Após 30 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas (4x) com PBST 0,05%, e foram adicionados 100 µL/poço de TMB Plus 2 (Kem-En-Tec Diagnostic, DK) e incubadas à temperatura ambiente, por 15 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 100µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M. A absorbância de cada reação foi mensurada em espectrofotômetro para microplacas (RChisto Sunrise, Tecan, Suíça), filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos como Índice de Reatividade (IR) de acordo com Silva et al., 2002, sob a fórmula:

$$IR = DO_{\text{amostra}} / DO_{\text{cut off}}, \text{ e valores de } IR > 1,0 \text{ foram considerados positivos.}$$

### 3.4.5. Processamento e purificação da IgY

Os ovos foram coletados, diariamente, a partir da primeira imunização, identificados e armazenados a 4 °C, até o momento do processamento.

A primeira etapa de purificação da IgY consistiu na precipitação com Polietilenoglicol 6000 (PEG-Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Para a delipidação, a gema foi diluída 1:5 em PBS (0,018 M, pH 7,6) e em seguida essa solução foi precipitada com 3,5% de PEG 6000, seguida de homogeneização constante. A solução foi mantida por 20 minutos à

temperatura ambiente e a seguir centrifugada a 5000 xg. O sobrenadante foi submetido a mais duas precipitações com 12% de PEG 6000. Ao precipitado foram adicionados 2,5 mL de PBS a 0°C e um volume igual de álcool etílico absoluto a 50%. A solução foi centrifugada a 10000 xg por 25 minutos a 5 °C negativos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 2,5 mL de PBS e mantido a -20°C até a etapa seguinte.

Na segunda etapa, a IgY precipitada em PEG foi purificada por cromatografia de afinidade tiofílica utilizando a coluna HiTrap IgY 5mL (GE, Healthcare). A solução de ligação utilizada foi a solução tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,5 e a eluição foi realizada com solução de ligação acrescida com 0,6M de sulfato de sódio pH 7,5. As frações com picos foram reunidas e concentradas em Amicon Ultra 50K (Millipore) de 50 mL e a quantificação da proteína foi estimada pela leitura espectrofotométrica a 280nm e calculada de acordo o coeficiente de extinção 1,33 para IgY (LESLIE; CLEM, 1969).

### **3.4.6. Análise da homogeneidade e especificidade IgY**

A homogeneidade da preparação purificada da IgY foi analisada por SDS-PAGE, utilizando-se diferentes concentrações para a amostra. As frações IgY obtidas na primeira etapa da purificação com PEG 6000 foram analisadas sob condições redutoras e não redutoras, utilizando o gel NuPAGE Bis-Tris mini gel 4-12% e tampão de corrida MES NuPAGE (ambos da Novex, Life Technologies). A migração foi realizada a 150 V durante 45 minutos. Os géis foram corados com Azul de Comassie R-250 e descorados com solução de ácido acético 10% (Harlow e Lanes, 1988). As frações IgY obtidas na segunda etapa de purificação, após a cromatografia de afinidade tiofílica HiTrap IgY, foram analisadas no sistema PhastGel (GE Healthcare) com concentração de poliacrilamida variando de 8 a 25%.

A reatividade cruzada da IgY foi analisada por *Western Blot* utilizando-se imunoglobulinas IgG de mamíferos purificadas. A IgG canina, de cobaia, de carneiro, de coelho, de equino e de suíno (Rockland-Inc) bem como IgG de gato purificada neste trabalho, foram submetidas ao SDS-PAGE NuPAGE de 4-12%. A transferência para a membrana de nitrocelulose foi realizada como descrita anteriormente. As tiras contendo as amostras foram bloqueadas por 16 h com solução tampão Tris-HCl 20mM contendo 5% de leite em pó desnatado Molico e, em seguida, lavadas 3 vezes com PBST, sob agitação constante. O conjugado IgY anti-IgG de gato marcado com peroxidase, diluído 1/500, foi acrescentado e incubado por 1h sob agitação. Após 3 lavagens com PBST, foi adicionada a solução de substrato-cromógeno contendo peróxido de hidrogênio a 30% e 3,3' Diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) em PBS. As bandas foram visualizadas após 10-15 minutos de incubação sob agitação suave, e a reação enzimática foi então bloqueada com água deionizada Milli-Q®.

## **3.5. Desenvolvimento do ELISA r-p24 IgY para Diagnóstico do FIV**

### **3.5.1. Preparo das amostras de referência**

O primeiro pool de amostras de referência foi constituído pelas amostras cedidas pelo Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária/UFRRJ. Entretanto, com o volume insuficiente para a realização de todos os ensaios, houve a necessidade de compor novas amostras de referência. Desta forma, a amostra de referência positiva e negativa foram constituídas de um pool de 12 amostras de soro de gatos testados por SNAP® FIV/FeLV Combo (IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, EUA), com resultados sabidamente positivos e negativos para o FIV, respectivamente.

### 3.5.2. Preparo da IgY anti-IgG de gato conjugada à peroxidase

A IgY purificada foi conjugada com peroxidase para sua utilização no ensaio imunoenzimático de ELISA r-p24 IgY para detecção de anticorpos específicos contra o FIV. A metodologia utilizada foi descrita por Nakane e Kawaoi (1974) e modificada por Camargo et al., (1987).

A primeira etapa da conjugação consistiu na dissolução de 4 mg de HRP em 1 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de solução de metaperiodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$  0,1 M) e a solução foi mantida sob agitação lenta, durante 20 min, à temperatura ambiente. Após este período, a solução foi dialisada em coluna de Sephadex G-25 (GE-Healthcare) e equilibrada com tampão de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  1mM, pH 4,4), conforme as recomendações do fabricante. O pH da mistura de peroxidase e metaperiodato foi ajustado para pH 9 com tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M, pH 9,0) e foi realizada a adição imediata à IgY anti-IgG de gato purificada (8 mg) dissolvida em 1 ml de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,01M, pH 9,5). Esta solução foi mantida durante 2 h, sob agitação lenta à temperatura ambiente. Em seguida, 0,1 mL da solução de borohidrato de sódio ( $\text{NaBH}_4$  0,1 M) foi adicionado à IgY e mantido durante 2 h, com agitação lenta à temperatura ambiente. O conjugado foi dialisado em coluna de Sephadex G-25 (GE-Healthcare) equilibrada com tampão fosfato salino de 0,1 M, pH 7,2. Ao final, foi acrescentada ao conjugado a solução estabilizadora (V/V) HRP StabilPLUS (KEM-En-Tec Diagnostic, DK) e foi armazenado a 4 °C.

### 3.5.3. Padronização do Elisa r-p24 IgY empregando as amostras de referência

A titulação cruzada foi empregada para estabelecer as condições ideais de uso dos insumos que compõem o teste. As concentrações do antígeno r-p24 utilizadas foram 25, 50, 100 e 200 ng/poço. As amostras de referência foram diluídas a 1:50 e 1:100 e o conjugado IgY anti-IgG gato/HRP foi avaliado nas diluições 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000, 1:8000. A diluição ideal destes insumos para uso no ensaio foi selecionada a partir da maior relação entre a  $\text{DO}_{450}$  da amostra referência positiva e a  $\text{DO}_{450}$  da amostra referência negativa.

A seguir, o Elisa r-p24 IgY foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 poços (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, DK) sensibilizadas com a proteína recombinante r-p24 purificada (200ng/poço), diluída em solução tampão carbonato/ bicarbonato pH 9,6 (15mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 35mM  $\text{NaHCO}_3$ ). Após 2 h a 37°C, as placas foram lavadas com uma solução PBST 0,05% (4x) e foram adicionados 100 µL/poço de cada amostra nas diluições testadas em tampão de amostra [PBST 0,05% pH 7,6 (9mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) com 10% (p/v) de leite em pó desnatado Molico (Molico<sup>®</sup>, Nestlé, BR), 0,05% Tween 20]. Após 30 minutos de incubação a 37°C, as placas foram lavadas quatro vezes com uma solução PBST 0,05% e foram adicionados 100 µL/poço da IgY anti-IgG gato/HRP na diluição 1:2000 em PBS acrescida de 10% leite em pó. Após 30 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas quatro vezes com uma solução PBST 0,05% e adicionados 100 µL/poço de TMB Plus 2 (Kem-En-Tec Diagnostic, DK) e incubadas à temperatura ambiente, por 15 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 100 µL/poço de uma solução contendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2M. A absorbância de cada reação foi mensurada em espectrofotômetro para microplacas (RChisto Sunrise, Tecan, Suíça), filtro de 450 nm.

### 3.5.4. Estabelecimento do ponto de corte

O valor do ponto de corte do teste foi calculado de acordo com o descrito por Jacobson (1998). Foram selecionadas 12 amostras de soros sabidamente negativas e três vezes o desvio padrão ( $\sigma$ ) foi utilizado para garantir um nível de confiança de 99,8%, sob a fórmula:

$$Cutoff = \text{Média } DO_{450} \text{ CN} + 3\sigma.$$

### 3.6. Validação do *Kit* de Elisa r-p24 IgY para Diagnóstico do FIV

Considerando os diversos cenários em que os testes diagnósticos são validados, este trabalho baseou-se nos critérios de validação preconizados pela OIE e pelo MAPA para o desenvolvimento e validação de produtos de uso veterinário, destinados a diagnosticar doenças dos animais.

#### 3.6.1. Sensibilidade e especificidade

Os estudos das sensibilidades analíticas e diagnósticas, assim como das especificidades analíticas e diagnósticas do teste Elisa r-p24 IgY foram realizados utilizando-se amostras de diferentes procedências sabidamente positivas ou negativas para a FIV.

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade analítica foram realizadas as diluições (1:50 a 1:6400) da amostra de referência positiva e definir o limite de detecção do anticorpo no teste.

Com a finalidade de avaliar a especificidade analítica foram testadas 28 amostras de soro de gatos positivas para FeLV, e destas, 4 amostras eram gatos co-infectados com FIV e FeLV.

A sensibilidade diagnóstica e a especificidade diagnóstica foram avaliadas com 251 soros de gatos positivos e negativos para o FIV confirmados no teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo (IDEXX Laboratories, Inc. EUA), realizado conforme as orientações do fabricante.

As fórmulas utilizadas para o cálculo da sensibilidade diagnóstica e especificidade diagnóstica foram:

Sensibilidade diagnóstica = Verdadeiros positivos  $\div$  (Falso negativo + Verdadeiro positivo).

Especificidade diagnóstica = Verdadeiros negativos  $\div$  (Falso positivo + Verdadeiro negativo).

#### 3.6.2. Repetitividade

O procedimento de determinação da repetitividade foi realizado numa mesma microplaca, com as amostras de referência positiva e negativa para o FIV.

A faixa aceitável do coeficiente de variação para os estudos de repetitividade não deve ser superior a 15% (OIE, 2014).

#### 3.6.3. Precisão intermediária

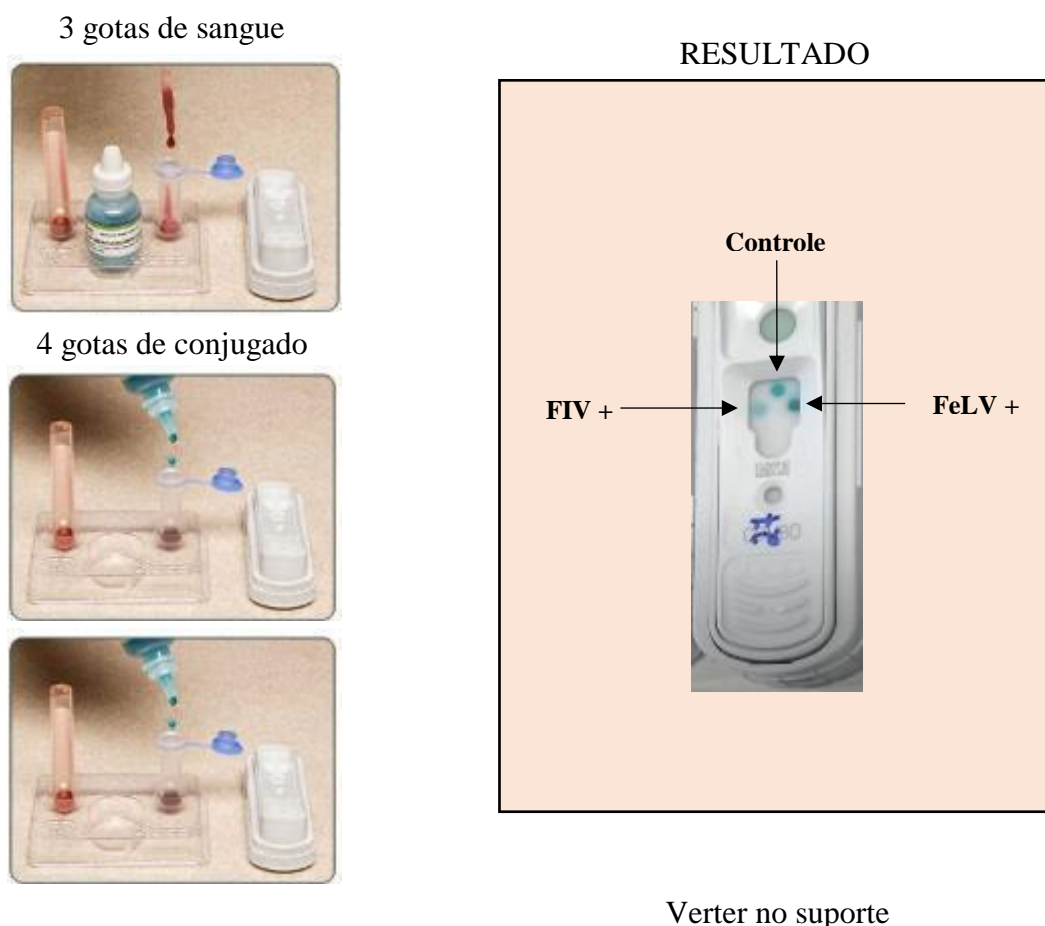
O procedimento de determinação da precisão intermediária foi realizado em 4 dias diferentes, com replicatas das amostras de referência negativas e positivas para a FIV.



A faixa aceitável do coeficiente de variação para os estudos de reprodutibilidade também não deve ser superior a 15% (OIE, 2014).

### 3.6.4. Concordância de desempenho do ELISA r-p24 IgY com o kit comercial

A concordância do ELISA r-p24 IgY foi verificada com o kit comercial SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo (IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, EUA). Foram avaliadas 251 amostras, entre positivas e negativas para a FIV no kit de ELISA r-p24 IgY em paralelo com o kit comercial. O teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo consiste num imunoenensaio rápido para detecção simultânea do antígeno do vírus da leucemia felina (FelV) e dos anticorpos específicos contra a glicoproteína gp 40 (proteína transmembranar) e p24 (proteína do capsídeo) do FIV no soro, plasma ou sangue total de felinos domésticos. O desenvolvimento de cor nos pontos da amostra é indicativo da presença de anticorpo contra o FIV ou de antígeno de FelV na amostra. A execução e o resultado do teste estão descritos na Figura 8 abaixo.



**Figura 8.** Teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo, IDEXX Laboratories, Inc. Fonte: <http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2010/felv/diagnosis.html>

### 3.6.5. Estudos de estabilidade

De acordo com o preconizado pelo MAPA (2008), o prazo de validade de kit destinado a diagnosticar doenças dos animais deve ser comprovado através de testes de estabilidade de longa duração (teste de prateleira). Para tanto, devem ser realizados testes com

a frequência comumente utilizado para os testes considerados mais críticos são de 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses enquanto que para aqueles considerados menos críticos, só é necessário apresentar o estudo no prazo de validade requerido comparativo ao momento zero. O MAPA recomenda que os analitos serão considerados estáveis, quando for observada uma degradação máxima de até 5% (MAPA 2005).

O Estudo de Estabilidade do ELISA r-p24 IgY foi realizado com os componentes do *kit*: placas sensibilizadas com a proteína r-p24 do FIV, controles positivo e negativo, IgY anti-IgG de gato conjugada à peroxidase, tampões para as diluições das amostras e do conjugado, e soluções para a lavagem das placas. Este estudo foi realizado empregando-se o estabilizador WellChampion, acrescido após a sensibilização da placa, por ser um reagente que combina o bloqueio com a estabilização da placa em uma única operação. A sensibilização da placa com a proteína r-p24 foi realizada conforme padronizado. Após o período de incubação, as placas foram vertidas e mantidas à temperatura ambiente por 2 h, em seguida, as placas foram seladas e mantidas nas suas respectivas temperaturas de 2 a 8°C, temperatura ambiente e à 37°C. Neste trabalho, os insumos do kit foram mantidos de 2 a 8°C e os componentes abertos foram utilizados conforme o número de testes realizados, e depois foram fechados e armazenados de 2 a 8°C. Os testes foram realizados nos períodos de 0, 3, 6, 9, 12 meses. Entretanto, o teste para avaliar a estabilidade do kit continuará até completar o período de 24 meses.

### **3.7. Comparação do ELISA r-p24 IgY com o ELISA Utilizando Imunoglobulina de Mamífero Conjugada à HRP (ELISA r-p24 IgG)**

O ELISA r-p24 IgG foi desenvolvido nas mesmas condições do ELISA r-p24 IgY, conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.3, 4.5.4, 4.6 e 4.7. A padronização do teste ELISA r-p24 IgG foi estabelecida, utilizando a proteína r-p24 na concentração de 100 ng/poço, as amostras de soros de gatos diluídas 1:100, e o conjugado comercial da imunoglobulina de coelho anti-IgG gato conjugada com peroxidase (Sigma<sup>®</sup> Co., EUA) diluída 1: 8 000. As soluções tampões foram os mesmos utilizados no ELISA r-p24 IgY.

### **3.8. Análise Estatística**

Na análise estatística foram determinados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia e índice *kappa* ( $\kappa$ ) através da Tabela de Contingência (2x2).

O grau de concordância obtido no ELISA r-p24 IgY frente ao teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo foi medido pela curva ROC utilizando o programa Sigma Plot, versão 10.0. A precisão global do teste (relação entre a taxa de verdadeiro positivos e a taxa de falso positivos) foi descrita como a área sobre a curva ROC, considerando concordância: excelente (> 0,9); boa (0,8 a 0,9); regular (0,7 a 0,8); ruim (0,6 a 0,7); reprovado (0,5 a 0,6). Foi utilizado o programa Prisma para os cálculos de significância nas repostas imunes das aves.

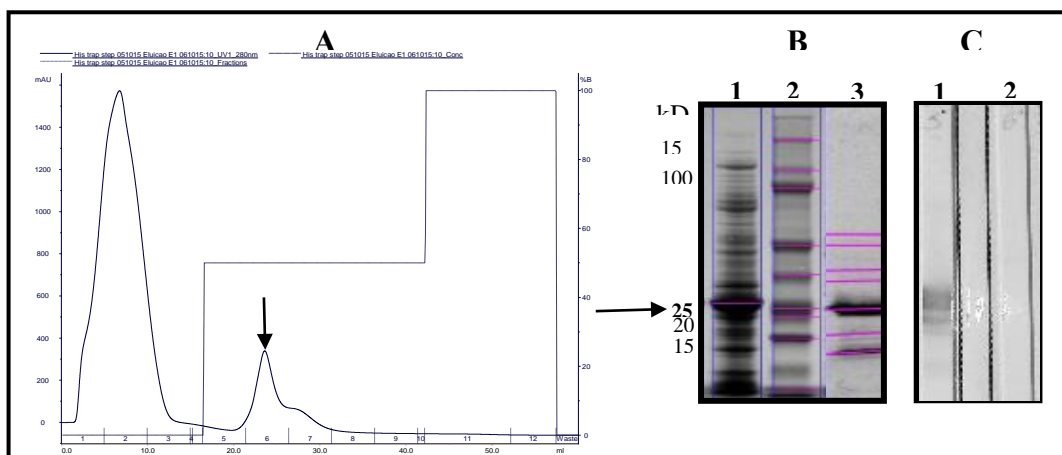
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise da Proteína r-p24: Produção, Purificação e Caracterização Físico-Química e Biológica

Na Figura 9, o Painel A mostra os resultados dos extrato provenientes do *pellet* bacteriano dos cultivos induzidos (volume total = 24 mL) submetidos à cromatografia de afinidade por níquel. O cromatograma referente à purificação da proteína r-p24 apresentou dois picos principais. As frações referentes ao primeiro pico foram constituídas pelos tubos 1 a 3 (volume total = 15 mL) demonstrando a fração que não interagiu com a matriz cromatográfica. As frações referentes ao segundo pico foram constituídas pelos tubos 6 e 7 (volume total = 10 mL), que foi a amostra adsorvida na matriz cromatográfica e eluída com o eluente B. O segundo pico, identificado com uma seta, contém a proteína recombinante, que foi submetida à ultrafiltração, obtendo-se um volume final de 1,2 mL e a concentração de 9,9 mg/mL.

Já o Painel B mostra a homogeneidade da proteína r-p24 purificada e analisada em SDS-PAGE gradiente 8 a 25% e coradas por Coomassie Blue R. Em condições redutoras, foi possível observar no lisado (extrato inicial) várias bandas localizadas entre 150 e 10 kDa, inclusive na altura do padrão de peso molecular de 25 kDa (indicada com uma seta). Após a purificação cromatográfica, também nesta construção, pode se observar a presença de uma banda majoritária que, com o auxílio do equipamento GelDoc XR+ permitiu estimar o peso molecular em 24,66 kDa, correspondendo a proteína r-p24.

E o Painel C mostra a análise da reatividade da proteína r-p24 purificada por *Western Blot* para confirmar a identidade das bandas observadas em SDS-PAGE. Pode se observar que os anticorpos anti-FIV presentes no soro reagiram com uma banda na região de 25 kDa (indicada com uma seta), confirmando a identidade da proteína r-p24 purificada.

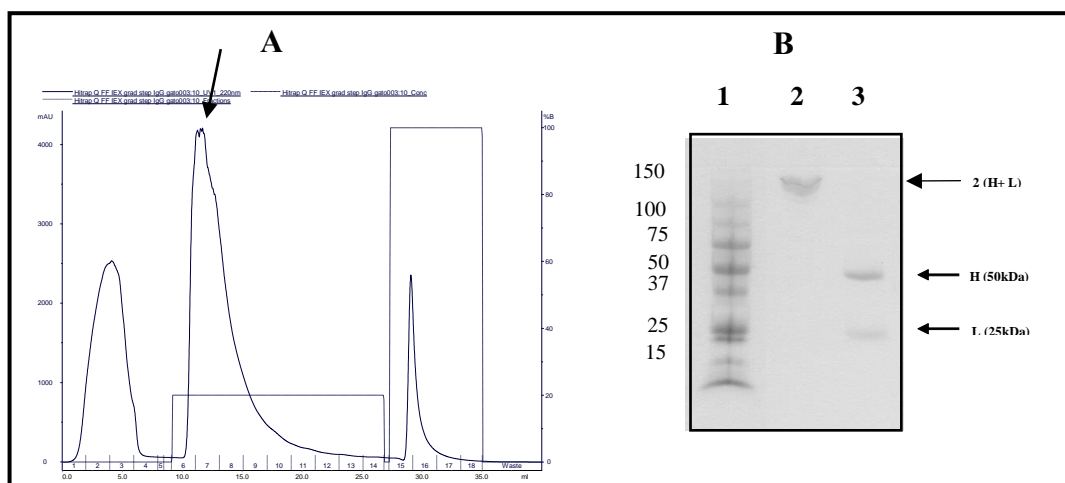


**Figura 9.** Análise da proteína r-p24. **Painel A** - Perfil cromatográfico obtido a partir da purificação da proteína r-p24 em HisTrap 5 mL crude FF. A linha contínua representa a absorbância a 280nm; a linha pontilhada representa a concentração do eluente B. **Painel B** - Análise em SDS-PAGE 8-25% das frações da proteína r-p24 em condições redutoras; Raia 1- Proteína r-p24 antes da purificação; Raia 2- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad) em kDa; Raia 3- Proteína r-p24 após purificação e concentração. A curva de calibração apresentou  $R^2$  de 0,991. **Painel C** - Western Blot da proteína r-p24. Raia 1- Amostra do soro de gato, positiva para FIV; Raia 2- Amostra de soro de gato, negativa para FIV. As setas indicam a proteína r-p24.

## 4.2. Análise da IgG de Gato: Produção, Purificação e Caracterização Físico-Química

Na Figura 10, o Painei A apresenta o perfil cromatográfico da IgG de gato purificada (volume total = 5 mL) aplicada em coluna de troca iônica Hitrap QFF 1mL. O cromatograma da purificação da IgG de gato apresentou um perfil de eluição com a presença de três picos principais, quando submetidas a gradiente descontínuo de NaCl. O primeiro pico foi constituído pelos tubos 1 ao 4 (volume total = 16 mL). O segundo pico foi o majoritário e foi constituído pelos tubos 6 ao 10 (volume total = 20 mL). O terceiro pico foi constituído pelos tubos 15 ao 17 (volume total = 12 mL). O segundo pico, identificado com uma seta, contém a fração de interesse e foi constituído pela fração com 20% de eluente a qual foi submetida a ultrafiltração, obtendo-se um volume final de 0,6 mL e a concentração protéica de 7,5 mg/mL.

Na Figura 10, Painei B apresenta a análise em SDS-PAGE 8-25% da fração de IgG de gato purificada na ausência de agente redutor (raia 2) e na presença (raia 3) de agente redutor. O resultado evidencia uma banda de alto peso molecular, acima do padrão de peso molecular de 150kDa, podendo estar relacionada a IgG não reduzida. A amostra aplicada com agente redutor evidencia a presença de duas bandas com peso molecular estimado em 25 kDa e 50 kDa correspondendo às cadeias leves e pesadas do IgG, respectivamente.



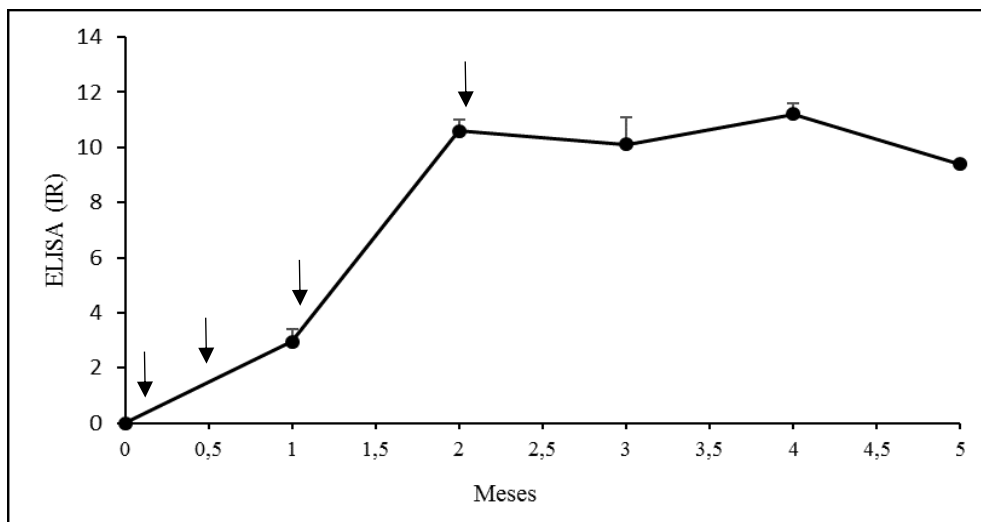
**Figura 10.** Análise da IgG de gato. **Painei A** - Perfil cromatográfico da purificação da IgG de gato em coluna de afinidade Hitrap Q FF 1mL. A linha contínua representa a absorvância a 220nm; A linha pontilhada representa a concentração do eluente B. As setas indicam as cadeias pesadas (H), leves (L) e pesadas e leves (H+L) da IgG de gato. **Painei B** - Análise em SDS-PAGE 8-25% da fração da IgG de gato. Raia 1- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad) em kDa; Raia 2- IgG de gato purificada sem agente redutor. Raia 3- IgG de gato purificada com agente redutor.

## 4.3. Análise da IgY: Produção, Purificação e Caracterização Físico-Química e Biológica

Após as imunizações com IgG de gato, as galinhas permaneceram saudáveis durante todo o período do experimento e não apresentaram efeitos adversos nos locais da injeção (dor ou dano tecidual) ou, até mesmo, redução da postura. A coleta dos ovos foi diária para ambas as galinhas.

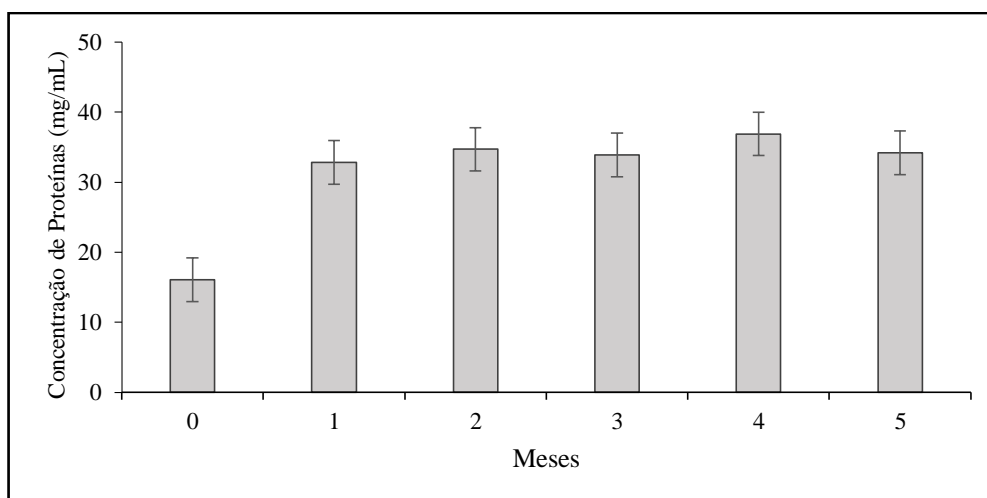
A produção de IgY específica foi analisada separadamente na galinha 1 e na galinha 2. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa na produção de IgY entre as galinhas (teste Mann-Whitney,  $U=152,0$ ;  $p<0,05$ ). Desta forma os resultados serão apresentados com a média obtida das duas galinhas.

A Figura 11 mostra a média da produção de IgY anti-IgG de gato encontrados nas gemas das galinhas obtidas por ELISA, durante os 5 meses do estudo. O resultado do ELISA demonstrou que as galinhas produziram anticorpos IgY anti-IgG de gato no primeiro mês, porém a maior concentração desses anticorpos foi encontrada após o segundo mês e manteve-se elevada até o final do experimento. A análise estatística mostrou um aumento significativo na produção de imunoglobulinas somente do mês 1 para o mês 2 do experimento (teste de Kruskal-Wallis,  $H=11,32$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 11.** Perfil da produção de imunoglobulina Y nos ovos das galinhas imunizadas com IgG de gato. (IR = Índice de reatividade. As barras verticais indicam o desvio padrão. As setas indicam os momentos das quatro imunizações nos intervalos de 1, 15, 30 e 66 dias.

A Figura 12 apresenta a média mensal da concentração protéica da IgY estimada a 280 nm das galinhas mostrando uma variação de 32,8 a 36,9 mg/mL, atingindo o pico máximo no 4º mês do experimento.



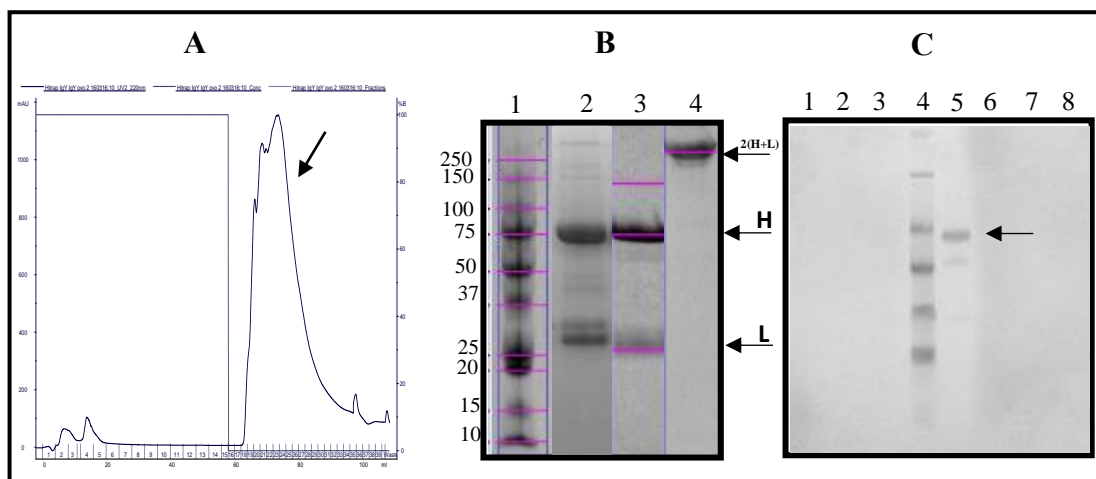
**Figura 12.** Média da concentração de proteína total na gema dos ovos das galinhas. Ovos coletados durante o período de cinco meses e purificados com PEG expressos em mg/mL. As barras verticais indicam o desvio padrão.

A Figura 13 apresenta os resultados do processo de purificação e a análise da pureza e especificidade da IgY anti-IgG de gato.

O painel A apresenta o perfil cromatográfico da purificação da IgY ( volume total = 5 mL) aplicado em cromatografia de afinidade tiofílica em coluna HiTrap IgY 5mL. O cromatograma da purificação da IgY apresentou um perfil de eluição com a presença de uma banda quando submetida ao tampão de eluição. O pico majoritário, identificado com uma seta, foi constituído pelos tubos 18 a 32 (volume total = 24mL) o qual foi submetido a ultrafiltração, obtendo-se um volume final de 1,5 mL e a concentração protéica de 5,37 mg/mL.

O painel B apresenta o perfil eletroforético em SDS-PAGE da IgY. A raia 2 apresenta a IgY precipitada com PEG 6000 em condições redutoras apresentando diversas bandas com pesos moleculares que variaram de 220 kDa a 25 kDa. As bandas principais apresentam o peso molecular próximo ao estimado para as cadeias leve e pesada da IgY (27 kDa e 68 kDa). A raia 3 apresenta a IgY purificada em HiTrap IgY em condições redutoras, revelando a presença de duas bandas, com pesos moleculares estimados em 78 kDa (indicado pela seta com a letra H), e 26 kDa (indicado pela seta com a letra L). A raia 4 apresenta a IgY purificada em HiTrap IgY em condições não redutoras revelou uma banda com peso estimado em 260 kDa (indicado pela seta com as letras H + L).

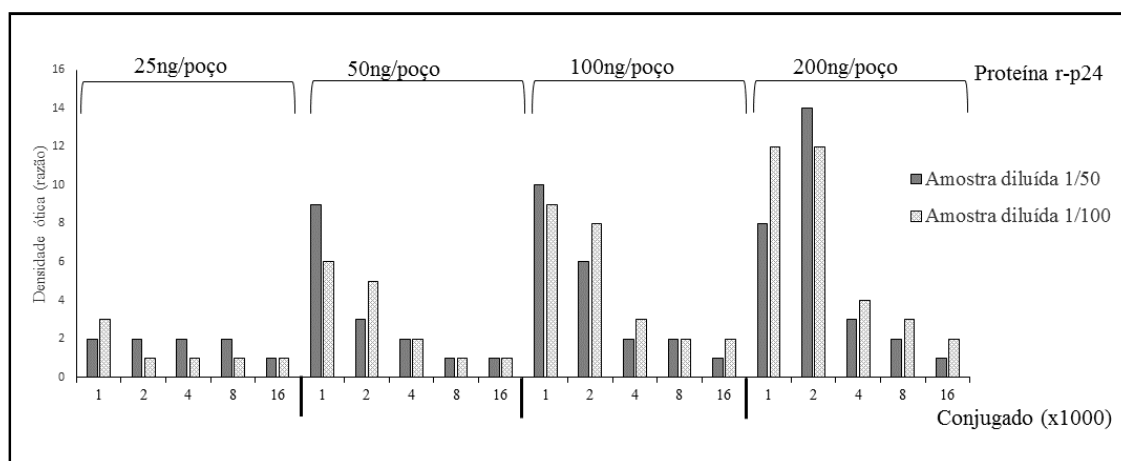
O painel C apresenta a reatividade cruzada da IgY por *Western Blot* demonstrou que a IgY purificada foi capaz de reconhecer de maneira específica somente a IgG de gato purificada, permanecendo sem reação as IgG de outros mamíferos (IgG de coelho, cavalo, cão, cabra, carneiro e cobaia).



**Figura 13.** Análise da IgY. **Painel A** - Perfil cromatográfico da purificação da IgY em coluna HiTrap IgY 5mL. A linha contínua representa a absorbância a 220nm; a linha pontilhada representa a concentração do eluente B. A seta indica a fração de interesse. **Painel B** - Análise por SDS-PAGE da IgY em condições redutoras; Raia 1- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad) em kDa; Raia 2- IgY após a purificação por PEG 6000; Raia 3- IgY após purificação em HiTrap em condições redutoras; Raia 4- IgY purificada em HyTrap em condições não redutoras. A curva de calibração apresentou  $R^2$  de 0,99. As setas indicam as cadeias pesadas (H), leves (L) e pesadas e leves (H+L) da IgY. **Painel C** - Análise por Western Blot da IgY purificada anti-IgG de gato. Raia1- IgG de coelho; Raia 2- IgG de cavalo; Raia 3- IgG de cão; Raia 4- Padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (BioRad); Raia 5- IgG de gato; Raia 6- IgG de cabra; Raia 7- IgG de carneiro; Raia 8- IgG de cobaia. A seta indica a reação da IgY purificada com a IgG de gato.

#### 4.4. Análise da Padronização do ELISA r-p24 IgY

A Figura 14 apresenta a titulação cruzada realizada com a proteína r-p24 e o conjugado IgY demonstrando as condições ideais de 200 ng/poço da proteína r-p24 para a sensibilização das placas, as amostras de soros de gatos diluídas 1/50 e o conjugado IgY/HRP diluído 1/2000.



**Figura 14.** Otimização do ELISA r-p24 IgY. Relação da média DO450 das amostras de referência positivas e negativas na diluições 1:50 e 1: 100; antígeno r-p24 nas concentrações 25, 50, 100 e 200 ng / 100 uL; IgY anti-IgG de gato conjugada nas diluições 1: 1000, 1: 2000, 1: 4000, 1: 8000, 1: 16000. Razão do conjugado (403:280) = 0,32.

Os resultados revelaram que a melhor discriminação as amostras de referência positivas apresentaram uma densidade ótica superior a 1,0, enquanto a amostra de referência negativa apresentou a densidade ótica abaixo de 0,1.

#### 4.5. Validação do *Kit* de ELISA r-p24 IgY

Fazem parte da validação do produto final deste trabalho, os testes analíticos para a avaliação de sensibilidade, especificidade, repetitividade e reprodutibilidade parcial e os estudos de estabilidade do *kit* ELISA r-p24 IgY.

##### 4.5.1. Sensibilidade e especificidade

As amostras foram caracterizadas como positivas no kit ELISA r-p24 IgY para FIV quando o valor de *cut-off* foi superior ou igual 0,104 e as amostras caracterizadas negativas quando o valor de *cut-off* foi inferior a 0,104.

A sensibilidade analítica apresentou o limite de detecção na diluição máxima da amostra de 1/800 (DO = 0,108).

A especificidade analítica demonstrou que as 28 amostras positivas para FeLV não apresentaram resultado falso positivo para o FIV e as 4 amostras de co-infecção foram positivas somente para FIV.

Os resultados da sensibilidade diagnóstica e da especificidade diagnósticas estão expressos no item 5.5.4.

#### 4.5.2. Repetitividade

A amostra de referência positiva apresentou reatividade em todas as replicatas e o coeficiente de variação foi de 4,7%.

A amostra de referência negativa apresentou resultado negativo em todas as replicatas, e o coeficiente de variação foi de 8,0%.

#### 4.5.3. Precisão intermediária

A amostra de referência positiva apresentou reatividade em todas as replicatas e o coeficiente de variação foi de 6,27%.

A amostra de referência negativa apresentou resultados negativos em todas as replicatas, e o coeficiente de variação foi de 5,28%.

#### 4.5.4. Estudo comparativo de desempenho do ELISA r-p24 IgY com o teste de referência

A comparação entre os resultados do ELISA r-p24 IgY em relação aos resultados do SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo FIV/FeLV Combo test estão apresentados na Tabela de Contingência. (Tabela 8) que mostra os resultados de 251 amostras de soros de gatos analisadas no ELISA r-p24 IgY e no teste SNAP<sup>®</sup> FIV / FeLV Combo. Das 251 amostras que foram utilizadas na validação, 43 (17,2%) foram positivas e 208 (82,8%) foram negativas utilizando o teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo. O ELISA r-p24 IgY identificou 44 (17,5%) amostras positivas e 207 (82,4%) amostras negativas. Portanto, duas amostras apresentaram resultados discordantes.

**Tabela 8.** Dados de contingência comparando os resultados do ELISA r-p24 IgY e o SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo.

ELISA r-p24 IgY	SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV Combo		Total
	Gatos infectados	Gatos não-infectados	
FIV +	42 (VP)	1 (FP)	43 (VP +FP)
FIV -	1 (FN)	207 (VN)	208 (FN+VP)
<b>Total</b>	43 (TP +FN)	208 (FP+TP)	251(n)

VP (verdadeiro positivo); VN (verdadeiro negativo); FP (falso positivo); FN (falso negativo);  
n= VP+VN+FP+FN; *Cut off*= 0.104.

A Tabela 9 apresenta os resultados de desempenho do ELISA r-p24 IgY em comparação com o ensaio de referência demonstrando a sensibilidade diagnóstica de 97,7%, a especificidade diagnóstica de 99,5%, a precisão de 99,2% e o índice kappa de 99,1%.

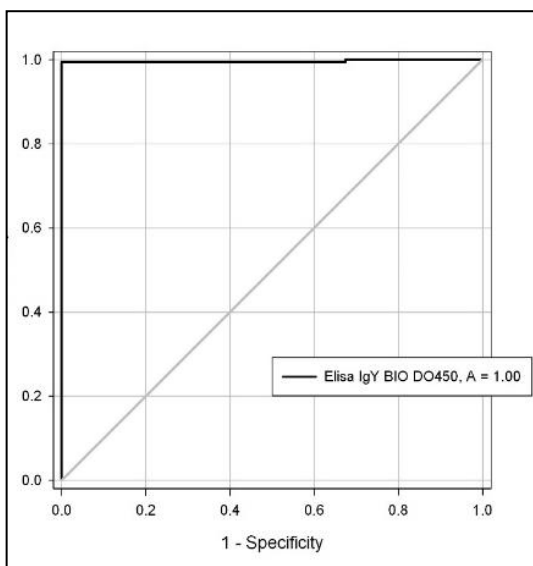
**Tabela 9.** Avaliação dos parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgY.

Parâmetro	Fórmula*	Valor (%)
Sensibilidade	VP/ (VP+FN)	97,7
Especificidade	VN/ (FP+VN)	99,5
Acurácia	(VP+VN) /n	99,2
Índice Kappa ( $\kappa$ )	(Po- Pe) / (1-Pe)	99,1

VP (verdadeiro positivo); VN (verdadeiro negativo); FP (falso positivo); FN (falso negativo); Po (proporção observada) = (VP+VN) /n; Pe (proporção esperada) = [ (VP+FP) (VP+FN) ]+[ (FN+VN) (FP+VN) ]/n<sup>2</sup>.



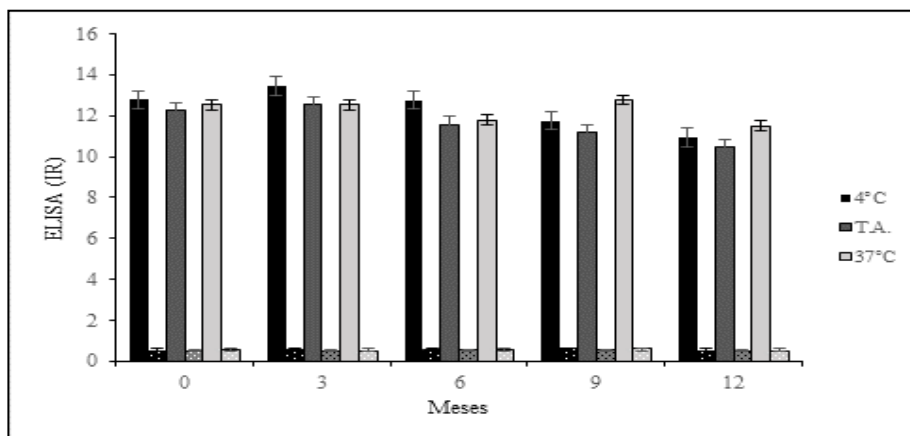
A Figura 15 apresenta a curva ROC demonstrando a acurácia de 0,9968 entre os testes avaliados com 95% no intervalo de confiança variando de 0.9903 a 1.003.



**Figura 15.** Curva ROC do ELISA r-p24 IgY. Demonstração da sensibilidade em função da especificidade.

#### 4.5.5. Estudos de estabilidade

A Figura 16 apresenta o resultado do estudo de estabilidade do kit ELISA r-p24 IgY durante o período mínimo de 12 meses, armazenado a 4°C, temperatura ambiente e 37°C. A análise dos índices de reatividade do *kit* ELISA r-p24 IgY demonstrou que o coeficiente de variação ficou na faixa de 0,8% a 7,4%, nas diferentes condições de armazenamento. O percentual do coeficiente de variação das amostras positivas foi de 1,9% a 3,9% no período de 12 meses. O maior percentual de coeficiente de variação das amostras negativas ocorreu no primeiro mês, atingindo 7,4%. Em seguida, houve uma redução gradativa da variação de queda da estabilidade do produto, com o coeficiente de variação atingindo 0,8% no mês 12.



**Figura 16.** Estudo da estabilidade do *kit* ELISA r-p24 IgY. O gráfico apresenta o índice de reatividade do *kit* ELISA r-p24 IgY submetido a diferentes condições de armazenamento durante 12 meses. As barras sólidas representam a amostra de referência positiva para o FIV e as barras pontilhadas representam a amostra de referência negativa para o FIV. As barras verticais indicam o desvio padrão.

#### 4.6. Estudo Comparativo de ELISA r-p24 IgY e ELISA r-p24 IgG

A comparação entre os resultados do ELISA r-p24 IgG em relação aos resultados do teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo estão apresentados nas tabelas abaixo.

A tabela 3 mostra os resultados de 251 amostras de soros de gatos analisadas no ELISA r-p24 IgG e no teste SNAP<sup>®</sup> FIV / FeLV Combo. Das 251 amostras que foram utilizadas na validação, 43 (17,2%) foram positivas e 208 (82,8%) foram negativas, utilizando o ensaio SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo. O ELISA r-p24 IgG identificou 41 (16,3%) amostras positivas e 210 (83,7%) amostras negativas. Portanto, quatro amostras apresentaram resultados discordantes.

**Tabela 10.** Dados de Contingência comparando os resultados do ELISA r-p24 IgG e o SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo.

ELISA r-p24 IgG	SNAP <sup>®</sup> FIV/FeLV Combo		Total
	Gatos Infectados	Gatos Não-Infectados	
FIV +	41 (TP)	2 (FP)	43 (VP +FP)
FIV -	2 (FN)	206 (TN)	208 (FN+VP)
Total	43 (TP +FN)	208 (FP+TP)	251(n)

VP (verdadeiro positivo); VN (verdadeiro negativo); FP (falso positivo); FN (falso negativo); n = VP+VN+FP+FN. *Cut off*= 0.268.

A Tabela 11 apresenta os resultados de concordância do ELISA r-p24 IgG em comparação com o ensaio de referência com a sensibilidade de 95,3%, a especificidade de 99%, a precisão de 98,4% , e o índice kappa de 94,3%.

**Tabela 11.** Avaliação dos parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgG.

Parâmetro	Fórmula	Valor (%)
Sensibilidade	VP/ (VP+FN)	95,3
Especificidade	VN/ (FP+VN)	99,0
Acurácia	(VP+VN) /n	98,4
Índice kappa ( $\kappa$ )	(Po- Pe) / (1-Pe)	94,3

VP (verdadeiro positivo); VN (verdadeiro negativo); FP (falso positivo); FN (falso negativo); Po (proporção observada) = (VP+VN) /n; Pe (proporção esperada) = [ (VP+FP) (VP+FN) ]+[ (FN+VN) (FP+VN) ]/n<sup>2</sup>.

A Tabela 12 apresenta os parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgY comparado ao ELISA r-p24 IgG.

**Tabela 12.** Avaliação da comparação dos parâmetros de concordância do ELISA r-p24 IgY e do ELISA r-p24 IgG.

Parâmetro	ELISA r-p24 IgY Valor (%)	ELISA r-p24 IgG Valor (%)
Sensibilidade	97,7	95,3
Especificidade	99,5	99,0
Acurácia	99,2	98,4
Índice kappa ( $\kappa$ )	99,1	94,3

## 5. DISCUSSÃO

Os anticorpos IgY proporcionam uma série de vantagens em imunodiagnóstico, quando comparado a IgG de mamíferos, devido a distância filogenética dos animais, mecanismos de diversificação imune e sua presença na gema do ovo. Além disso, esse método de produção de anticorpo está de acordo com os esforços internacionais para reduzir, refinar e se possível, substituir animais em experimentação, contribuindo substancialmente a favor do bem-estar animal.

Neste estudo, a tecnologia IgY foi aplicada para demonstrar um método alternativo ao uso de anticorpos IgG anti-gato com foco no campo do imunodiagnóstico para a infecção pelo FIV.

O FIV tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que causa distúrbios imunológicos associados a infecções oportunistas e neoplásicas em gatos domésticos que podem ser fatais. Além disso, se trata de uma doença de difícil diagnóstico clínico, em consequência de uma grande variedade de sinais clínicos inespecíficos nos gatos, necessitando de métodos de diagnósticos laboratoriais específicos.

No Brasil ainda há necessidade de importação de *kits* a custos elevados, dificultando a pesquisa e o diagnóstico da infecção causada pelo FIV. Em contrapartida, os elevados custos estimulam o desenvolvimento de ensaios com tecnologia nacional. Contudo, a credibilidade atribuída aos resultados obtidos a partir do desenvolvimento dos ensaios laboratoriais é dependente, em grande medida, da validação do método utilizado. Um método validado deve ser comprovado por avaliação e fornecimento de evidências que os requisitos para um determinado uso pretendido tenham sido cumpridos (OIE, 2016).

A **primeira etapa** para o desenvolvimento do ELISA r-p24 IgY consistiu na análise da literatura dos documentos próprios para produtos de uso veterinário destinados a diagnosticar doenças dos animais disponibilizados pelo MAPA e pela OIE. A metodologia ideal de validação é aquela que tenha progredido por meio de um estudo baseado em protocolos internacionais de realização e interpretação harmonizados de estudos propostos para avaliação de desempenho dos testes (DINIZ, 2013). A consulta às diretrizes sobre validação divulgadas pela OIE forneceu informações detalhadas e exemplos que respaldam as normas de validação publicadas no Manual de Testes para Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres. Esta busca evidenciou um crescimento significativo na área de desenvolvimento e validação de *kits* para diagnósticos nacionais. Porém, levando-se em conta que um repertório crescente de novos reagentes para diagnóstico, novas plataformas tecnológicas e a atualização constante dos regulamentos técnicos, ainda persiste a necessidade de incrementar procedimentos de validação, muitas vezes existentes, mas não devidamente esclarecidos pelos órgãos reguladores competentes.

Desta forma, a consulta aos documentos internacionais potencializou tanto a inclusão quanto o esclarecimento de determinados parâmetros de desempenho ou critérios de validação de métodos para o desenvolvimento deste novo produto para o diagnóstico da FIV, denominado ELISA r-p24 IgY.

O primeiro passo para o desenvolvimento de um teste diagnóstico é definir claramente o propósito e aplicação do teste em questão. O ELISA r-p24 IgY para detecção de anticorpos anti-FIV, gerados como resposta ao agente infeccioso, constitui um método indireto de diagnóstico para indicar uma infecção prévia ao FIV. Visto que os testes para a detecção de anticorpos possuem uma variedade de propostas de uso, o teste deve apresentar uma configuração prática e apropriada para atingir os propósitos a que se destina. O ELISA r-p24 IgY tem como proposta de uso demonstrar que uma determinada população de gatos se encontra livre da infecção pelo FIV, assim como diagnosticar a infecção mais precocemente possível, evitando a disseminação da doença e utilizar em estudos epidemiológicos para

estimar a prevalência da doença. O princípio do ensaio por ELISA r-p24 IgY para avaliar a presença de anticorpos anti-FIV é baseado na sensibilização da microplaca com a proteína recombinante (r-p24) do FIV, na qual se acrescenta a amostra de soro do gato com a presença ou não de anticorpos específicos para o FIV. A presença do imunocomplexo será detectada após a adição do conjugado IgY anti-IgG de gato marcado com HRP e na presença do anticorpo anti-FIV, o substrato comercial adicionado ao sistema produzirá uma cor que é lida em absorbância a 450 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração do anticorpo de interesse. Seguindo as orientações descritas nas Normas Técnicas para a Fiscalização da Produção, Controle, Comercialização e Modo de Utilização de Produtos Uso Veterinário (MAPA, 2003), este produto foi desenvolvido em instalações e edificações construídas, adaptadas e mantidas de forma adequada às operações que foram executadas, cumprindo a exigência alusiva ao produto de uso veterinário destinados ao diagnóstico de animais. Os insumos utilizados no desenvolvimento e validação do *kit* estavam de acordo com os padrões preestabelecidos de pureza e qualidade, assim como, os equipamentos de medida aferidos e calibrados. Todas as etapas de produção e controle de qualidade do *kit* ELISA r-p24 IgY foram registradas em protocolos específicos, de acordo com as normas de BPF, de forma a permitir a verificação das ações e rastreabilidade das informações (MAPA, 2003).

A **segunda etapa** deste trabalho foi a produção da proteína recombinante r-p24 do FIV. O uso da tecnologia de DNA recombinante para a aplicação no diagnóstico de uma determinada doença nos animais favoreceu os ensaios com uma maior especificidade e sensibilidade, devido à ausência de proteínas celulares do hospedeiro na preparação de antígenos recombinantes que diminuem drasticamente a taxa de reações falso positivas. Tendo em vista as dificuldades na obtenção de lentivirus a partir de cultura de células, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante tornou factível e satisfatória a produção de biomassa da r-p24 acompanhada dos estudos de caracterização físico-química e biológica da proteína. O protocolo de expressão e purificação mostraram ser eficientes, uma vez que permitiram a produção da proteína recombinante em quantidade suficiente para a purificação a partir de 200 mL de cultura. A utilização de em um único processo de purificação da proteína r-p24 expressa em *E.coli*, utilizando a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), realizada em resina quelante, utilizada para separar proteínas com calda de histidina que apresentam alta afinidade por metais, com o uso de eluição em modo degrau, demonstrou uma boa resolução no processo de purificação no que diz respeito à homogeneidade da proteína. O acompanhamento do procedimento pelo cromatógrafo Akta *Purifier* 10 possibilitou controlar cada etapa da purificação e estabelecer as condições cromatográficas ideais e a resolução do pico de interesse. Do ponto de vista industrial, a utilização da IMAC tem sido uma técnica muito utilizada para a purificação de proteínas devido ao seu baixo custo, especificidade, fácil regeneração e sem degradação química ou microbiológica, durante a estocagem. Estes fatos que tornam importante a IMAC sob o ponto de vista de ampliação de escalas e industrial, conforme citado por Bresolin et al., (2009). A utilização de procedimentos cromatográficos automatizados no processo de validação de ensaios veterinários, para garantir a resolução, adequada separação (pureza) dos picos cromatográficos e a utilização de testes de resolução de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos) são procedimentos recomendados pelo MAPA (2003).

Para garantir a qualidade dos resultados obtidos após a purificação, é necessária uma completa avaliação da proteína r-p24. Desta forma, foi realizada a combinação de metodologias de natureza físico-química e biológica para a completa identificação e caracterização da proteína, uma vez que estes ensaios não provem informação suficiente separadamente. Neste sentido, a técnica SDS-PAGE foi usada para a avaliação do peso molecular e pureza da proteína, devido principalmente a sua facilidade, eficácia e baixo custo (WARD; SWIATEK, 2009). Por outro lado, a análise da homogeneidade do antígeno r-p24

purificado empregando o programa ImageMaster<sup>®</sup> possibilitou estimar corretamente a massa molecular em 24,66 kDa mediante a presença de uma banda bastante expressiva no SDS-PAGE, correspondendo ao peso molecular estimado para a proteína r-p24.

A preservação da atividade biológica da proteína é um indicador importante no processo de purificação. Neste trabalho, a reatividade da proteína r-p24 purificada quando tratada com solução tampão de amostra de SDS-PAGE demonstrou que a proteína produzida atua como epítomos lineares, uma vez que os anticorpos anti-FIV reconhecem as proteínas desnaturadas. O uso do *Western Blot* com SDS-PAGE em condições desnaturantes possibilitou a visualização da reação do soro positivo com a presença de banda de, aproximadamente, 25 kDa referente à proteína r-p24.

A **terceira etapa** deste trabalho, consistiu na obtenção de anticorpos IgY anti-IgG de gato, a partir da inoculação em galinhas poedeiras. Os anticorpos policlonais para o desenvolvimento ou para a produção de *kits* de diagnóstico, normalmente, demandam o uso de animais de laboratório, principalmente coelhos, mas também camundongos, ratos e cobaias, ou, mamíferos de grande porte, tais como cavalos, ovelhas e cabras. O aspecto benéfico deste método alternativo de produção de anticorpo, utilizando ovos de galinhas poedeiras imunizadas com IgG de gato é indubitavelmente, a mais relevante das premissas deste trabalho por estar de acordo com o princípio dos 3 Rs.

Alguns fatores devem ser levados em consideração na verificação da resposta imune em galinhas imunizadas: a própria ave (linhagem, manejo, condições de estresse, nutrição), dose do antígeno (interfere diretamente na titulação de anticorpos), o adjuvante utilizado (ROCHA, 2010) e a via de aplicação (intravenosa, ocular, intramuscular e subcutânea) (KOENEN et al., 2002; SCHADE et al., 1996). A dose recomendada de antígeno solúvel para aves, especialmente sendo uma imunoglobulina de mamífero, é geralmente de 10 µg a 1000 µg (SCHWARZKOPF et al., 2001; COOK; TROTT, 2010). As concentrações muito altas ou baixas de antígenos podem induzir efeitos imunomoduladores indesejáveis ou tolerância e supressão (SCHWARZKOPF et al., 2001). Behn et al., (1996) não encontraram diferenças significativas em frangas inoculadas com IgG de camundongo, nas concentrações de 100 e 500 µg. Santos et al. (2014) relataram uma alta produção de IgY nas galinhas imunizadas com 200 µg de IgG canina. Neste estudo, as inoculações das galinhas com 250 µg de IgG de gato foram pautadas em conhecimento adquiridos de experimentos anteriores do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária e do LATED.

O estímulo à resposta imune é feito utilizando-se o antígeno combinado com vários compostos adjuvantes (HILGERS et al., 1998). Os adjuvantes de Freund são os mais utilizados na produção de anticorpos, entretanto, o adjuvante completo de Freund, por conter óleo de parafina e micobactérias liofilizadas, é diretamente responsável pela maioria das lesões granulomatosas nos locais da inoculação (WANKE et al, 1996). Neste estudo, a combinação da concentração do antígeno e a utilização do adjuvante de Freund, foi bem tolerada e não produziu reações inflamatórias locais nas galinhas. Estes resultados corroboraram com os experimentos realizados por Santos (2012) e de Paula et al, (2011).

A coleta de ovos foi iniciada anterior a primeira imunização e a avaliação da produção de IgY específica em ambas as galinhas foi acompanhada por ELISA durante 5 meses. Nos estudos da estabilidade da IgY em diferentes temperaturas de congelamento, foi observada uma perda de 50% de atividade desses anticorpos quando conservados a -70°C por 12 meses (STAAK, 2001). O mesmo estudo mostrou que quando a IgY conservada a -20°C ocorre mínima perda dessa atividade. Entretanto, Goldring e Coetzer (2003) afirmaram que a IgY isolada não deveria ser congelada e que estocada a 4°C permaneceria viável por diversos anos.) Em nosso estudo, os ovos foram mantidos por cerca de 1 mês a 4 ° C, e os resultados demonstraram que a atividade biológica dos anticorpos IgY anti-IgG de gato foi preservada e

manteve-se elevada, após o processo de extração da IgY, corroborando com os resultados encontrado por de Paula e colaboradores (2011).

A cinética do aparecimento da IgY anti-IgG de gato na gema dos ovos das galinhas inoculadas foi realizada por ELISA, pelo período de 5 meses. De acordo com a literatura, a cinética de produção de anticorpos nas gemas das galinhas imunizadas pode começar imediatamente na semana seguinte, após a segunda inoculação (MICHAEL, et al, 2010). Santos et al (2014) obtiveram resultados semelhantes com a produção de anticorpos na gema em galinhas inoculadas com IgG de cão, em um experimento seguido por 4 meses. Os mesmos resultados foram alcançados por Bizanov e Jonauskienė (2003) com a inoculação de IgG de porco e um acompanhamento da resposta imune pelo mesmo tempo. Neste trabalho, as galinhas apresentaram um aumento gradativo do título de anticorpos na gema a partir da segunda semana, com um aumento significativo no 2º mês e mantendo-se elevado durante todo o período de observação, corroborando com os resultados descritos na literatura.

Outro ponto a ser considerado é a variação da concentração de anticorpos específicos que é dependente, não somente do processo de imunização e da resposta imune do animal utilizado, mas também do método utilizado para estimar a concentração de proteína (DUBIE, et al., 2015). Relatos da literatura citam que a concentração de proteínas totais por ovo pode variar na faixa de 50-100 mg (KOVACS-NOLAN; MINE, 2004), ou até mais altas, chegando a 375 mg/ovo (ROSE et al., 1974; BERGHMAN et al., 2005). Neste estudo, a concentração de proteína da gema dos ovos foi estimada semanalmente por espectrofotometria (280 nm). A concentração de IgY na galinha 1 variou de 20,1 a 69,3 mg/mL, com uma média de 40,1 mg/mL no período de 5 meses. Na galinha 2, a concentração de IgY variou de 21,1 a 61,2 mg/mL, com uma média de 32,2mg/mL no mesmo período. Resultados similares aos encontrados neste trabalho foram descritos por Pauly et al. (2009) ao imunizarem galinhas com ricina e toxina botulínica e obtiveram uma concentração de 30 mg/mL no início do experimento, chegando à concentração de 80 mg/mL, ao final de dois anos de experimento.

Na literatura são descritos muitos métodos de extração e purificação cromatográficos para a obtenção da IgY mesmo em grande escala (Quadros 3 e 4). Na prática, a escolha dos processos de extração ou purificação geralmente é influenciada pelo rendimento e grau de pureza desejado, pela aplicação pretendida do anticorpo, bem como custos de material, da tecnologia e da experiência do laboratório envolvido (SCHWARZKOPF; THIELE, 1996). A ênfase deste trabalho é a aplicação da IgY no imunodiagnóstico, após a conjugação à enzima peroxidase. O uso de um insumo para fins de diagnóstico deve apresentar um elevado grau de pureza obtido por processos cromatográficos. Entretanto, o alto teor de lipídeos presentes na gema do ovo interfere nas etapas de purificação cromatográficas a base de afinidade (HANSEN et al., 1998). Portanto, é fundamental um processo de delipidação para extrair os lipídeos insolúveis e lipoproteínas (KO; AHN, 2007; TAN et al., 2012). O processo de delipidação é o passo de maior dificuldade no isolamento da IgY (KIM et al., 1999). Neste trabalho o primeiro passo no isolamento da IgY das gemas dos ovos implicou no uso de um agente precipitante, o PEG 6000, para a remoção de lipídeos e a precipitação da IgY. Este polímero não-iônico foi utilizado para isolar IgY devido ao baixo custo, pela facilidade do processamento das amostras e pelo significativo grau de homogeneidade obtido. As taxas de recuperação, após o isolamento descritas na literatura, estão na faixa de 15 a 150 mg de IgY/ovo (BIZANOV; VYSHNIAUSKIS, 2000; STALBERG; LARSSON, 2001), entretanto, deve se considerar que, o método usado para a quantificação associado ao processo de isolamento dispõem de uma grande influência na avaliação do rendimento da recuperação da IgY (TAN et al., 2012). Neste trabalho, a precipitação com PEG no processo de isolamento mostrou uma recuperação em torno de 84,5 mg de IgY/ovo, corroborando com os dados da literatura.

Segundo Meulenaer e Huyghebaert (2001), a cromatografia de afinidade é o melhor tipo de cromatografia a ser utilizada para purificação de IgY. Contudo, a eluição empregada pode ter efeito deletério sobre a atividade do anticorpo (CARROL et al., 1992). Neste trabalho foi utilizada uma coluna cromatográfica de interação tiofílica específica para a purificação de IgY. Os resultados no SDS-PAGE demonstraram que, em um único processo cromatográfico, foi obtida a IgY anti-IgG de gato com a homogeneidade necessária para os fins pretendidos. A avaliação do grau de homogeneidade da IgY, após a purificação por SDS-PAGE, demonstrou que o processo de purificação foi capaz de remover a ovalbumina e as chamadas proteínas acessórias. Estas proteínas apresentam peso molecular estimado entre 56,2 e 38,5 kDa (PAULY et al., 2011; MATHEIS; SCHADE, 2011), dentre as quais encontra-se a  $\beta$ -livetina ou fosvitina, provavelmente, fragmento C-terminal do precursor de vitelogenina II (KLIMENTZOU et al., 2006). A presença de proteínas acessórias ou impurezas não removidas no processo de purificação podem interferir diretamente no processo de conjugação da IgY, com diferentes tipos de enzimas e fluorocromos.

Gutiérrez e col. (2007) relataram que um anticorpo IgY para ser considerado consistente para qualquer finalidade, quando avaliado por ELISA, deve apresentar uma densidade óptica superior a 0,3 na amostra diluída 1:1000. Neste estudo, o monitoramento da produção de anticorpos IgY realizado por ELISA, com as amostras diluídas 1:1000, apresentaram valores de  $DO_{450}$  em torno de 1,5, no mínimo, cinco vezes superior ao considerado por Gutiérrez como um insumo produtivo de anticorpos IgY.

A avaliação da reatividade da IgY anti-IgG de gato frente a outras imunoglobulinas de mamíferos comprovada pelo *Western Blot* demonstrou que a reação da IgY foi específica ao reconhecer somente a IgG de gato.

O conjunto dos resultados obtidos mostraram que o inóculo IgG de gato purificado por cromatografia de troca iônica associado ao esquema utilizado para imunização das galinhas, mostrou-se eficiente para a produção de IgY. Além disso, o isolamento com PEG 6000 e a purificação por cromatografia de adsorção tiofílica permitiu a obtenção da IgY com elevado grau de homogeneidade, usando um processo simples e reprodutível na qual a atividade dos anticorpos IgY foi preservada.

A **quarta etapa** deste trabalho consistiu no emprego da tecnologia IgY para o desenvolvimento, padronização e a validação do teste de Elisa r-p24 IgY para o diagnóstico da infecção causada pelo FIV.

A otimização é uma etapa recomendada no desenvolvimento de um ensaio. Nesta fase, os componentes a serem considerados para a otimização do ELISA são as variáveis de diluições: do antígeno, da amostra (anticorpo), do anticorpo conjugado e a concentração da solução de substrato. A análise de todas estas variáveis deve proporcionar a melhor detecção ao que se propõe identificar e a definição do melhor tempo de incubação dos insumos para o teste em desenvolvimento (JACOBSON, 1998). Estes parâmetros são comprovados mediante avaliações como em um tabuleiro de xadrez (cada variável é comparada com as demais em um mesmo teste repetido várias vezes), também denominada de titulação cruzada. Outras variáveis também devem ser consideradas, como o pH e a força iônica dos insumos utilizados na execução do teste. Não menos importante é a seleção de equipamentos (leitores, lavadoras de placa, etc.) calibrados antes de seu uso - fazendo parte do programa de controle da qualidade do laboratório. No processo de otimização do ELISA r-p24 IgY obteve-se uma redução de 18 horas para 2 horas na adsorção do antígeno r-p24 na microplaca. O mesmo ocorreu com a redução de 60 min. para 30 min., no tempo de incubação das amostras. Estas expressivas reduções nos tempos das incubações possibilitaram a execução do teste no mesmo dia e conseqüente liberação mais rápida dos resultados das amostras em análise.

Segundo a OIE (2014), nas diretrizes de desenvolvimento e otimização dos testes para detecção de anticorpos, deve ser dada uma especial atenção aos valores de D.O. O teste deve

apresentar uma razoável separação dos valores de D.O. entre as amostras negativas e fracamente positivas. O valor de D.O. para o controle negativo no ensaio ELISA indireto deve ser de 0,1 ou inferior e o valor de D.O. do controle positivo não deve ser superior a 2,0. Esta recomendação é feita considerando que, uma vez acima deste valor, os leitores de placas podem tornar-se bastante imprecisos. Neste trabalho as amostras de referência negativas e positivas apresentaram uma D.O. de 0,077 e 1,385, respectivamente, corroborando com as recomendações da OIE.

A caracterização da eficiência no processo de conjugação de anticorpos com a peroxidase pelo método do meta-periodato de sódio pode ser traduzida pela análise das razões das absorbâncias a 403 e 280 nm (403:280). De uma forma geral, as razões de absorbância no intervalo de 0,3 a 0,5 simbolizam uma elevada atividade da enzima HRP sem afetar a atividade do anticorpo (CATTY et al., 1983 *apud* GUTIÉRREZ et al., 2007). Neste trabalho, a razão de 0,32 foi obtida no conjugado IgY anti-IgG de gato ligado à HRP demonstrando que este insumo é adequado ao uso para o ELISA. Entretanto, este conjugado com o título >1:4000 não apresentou reatividade satisfatória, conforme figura 14, independente da concentração de antígeno como captura. Os melhores títulos do conjugado foram 1:1000 e 1:2000, sendo escolhido 1:2000 com o antígeno na concentração de 200 ng/poço. Considerando que os anticorpos IgY apresenta uma reação semelhante a IgG, o método de conjugação do meta-periodato de sódio é aplicável para a obtenção de conjugados enzimáticos com anticorpos aviários. Cumpre ressaltar que, o estabelecimento da padronização do processo de conjugação da IgY anti-IgG de gato à peroxidase pode ser considerada uma ferramenta importante para a utilização no desenvolvimento de testes para o diagnóstico de várias doenças dos felinos domésticos.

A validação de testes diagnósticos é um processo que determina a capacidade de um ensaio, o qual foi devidamente desenvolvido, otimizado e padronizado, para um fim pretendido. Portanto, a validação é necessária para avaliar o desempenho analítico e diagnóstico, e assim demonstrar confiabilidade no teste desenvolvido (JACOBSON., 1998; OIE, 2016). O desempenho do ELISA r-p24 IgY foi comparado frente ao teste comercial SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo, considerado neste trabalho como teste de referência.

O limite de detecção é a menor concentração que um método pode detectar com certeza e está relacionada com a sensibilidade analítica do teste. Na prática, o que se busca é um elevado nível de sensibilidade analítica e um baixo limite de detecção. Apesar do ELISA r-p24 ser um teste qualitativo e portanto, o limite de detecção não é determinado, por analogia ao teste de referência, chegou-se a uma conclusão que há uma tendência de quanto mais intensa for a marcação do teste comercial, maior será a leitura da amostra no ELISA r-p24 IgY. A análise da amostra de referência positiva em diluições seriadas foi realizada e demonstrou que na diluição 1/800, que foi a última que apresentou positividade, foi considerado o limite inferior de detecção da concentração de anticorpo anti-FIV capaz de ser detectada no teste produzindo um resultado positivo.

A especificidade analítica do teste foi demonstrada pela ausência de reação cruzada com soros positivos para a infecção pelo FeLV (28/251). As 28 amostras que foram positivas para o FeLV não apresentaram reação cruzada, demonstrando a possibilidade de diferenciar as duas infecções causadas por vírus da mesma família e que podem levar a sinais clínicos muito semelhantes causados pela imunossupressão, mas que possuem respostas ao tratamento e prognósticos diferentes.

A acurácia (AUC) de 99% reflete a elevado grau de concordância do ELISA r-p24 IgY com o teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo. Este resultado foi reproduzido quando a precisão foi quantificada através da área sob a curva ROC, demonstrando que o ELISA r-p24 IgY mostrou uma capacidade de discriminação de 99% entre gatos soropositivos e soronegativos pelo teste de referência. As interpretações sugeridas por Greiner e Gardner (2006) descrevem



que valores intermediários para a área é: baixo ( $0,5 < AUC \leq 0,7$ ), moderada ( $0,7 < AUC \leq 0,9$ ) e acurácia elevada ( $0,9 < AUC \leq 1$ ). Desta forma, considerando esta interpretação, o ELISA r-p24 IgY apresenta acurácia elevada. A análise do índice kappa avaliou a reprodutibilidade pelo grau de concordância entre os resultados das duas observações, considerando a proporção de observado em relação ao esperado. O índice kappa de 99,1% é considerado como uma excelente concordância entre os dois testes (MCGINN et al., 2004).

A precisão do ELISA r-p24 IgY foi observada pelos baixos valores dos coeficientes de variação (CV) na repetibilidade (4,7% a 8%) e na precisão intermediária (5,2% a 6,2%). Os valores de CV abaixo de 15% são considerados ideais para testes diagnósticos pela OIE (2014). A literatura descreve que valores de CV abaixo de 5% para testes automatizados e 10% para testes manuais são considerados aceitáveis para testes diagnósticos (JENSEN; KJELGAARD-HANSEN, 2010). Considerando o ELISA r-p24 um teste qualitativo, valores menores de CV podem ser obtidos controlando e caracterizando os insumos empregados, como o conjugado. Um teste diagnóstico ideal deve possuir alta sensibilidade e alta especificidade, com o intuito de evitar resultados falso negativos e falso positivos, respectivamente (HARDY, 1991; JACOBSON, 1991). Isto é importante principalmente na infecção pelo FIV, pois uma vez que os animais forem infectados, é inexistente a possibilidade de recuperação da infecção (HARTMAN, 1998). Portanto, alta sensibilidade é necessária para possibilitar a separação dos animais infectados dos não infectados e assim diminuir a disseminação da infecção e também propiciar tratamento específico para os animais positivos (SELLON; HARTMANN, 2006). Considerando que os gatos FIV positivos apresentam uma fase assintomática longa, um teste com alta especificidade pode evitar a resistência à adoção de animais de abrigos, devido a resultados falso positivos, principalmente, em regiões com baixa prevalência da doença (HOSIE et al., 2009).

Os valores de sensibilidade (97,7%) e especificidade (99,5%) verificados no ELISA r-p24 IgY aproximam-se de dados obtidos em outros estudos que, ao avaliarem diferentes testes comerciais para a detecção de anticorpos anti-FIV, observaram valores de sensibilidade variando de 92,1 a 100%; e de especificidade, de 98,9 a 100% (HARTMANN et al., 2007). O desempenho do teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FeLV Combo foi avaliado com sensibilidade de 100% e especificidade 99,6%. De acordo com Camargo e cols. (1987), um imunoensaio é satisfatório quando a sensibilidade e especificidade são superiores a 90%. Com valores elevados de sensibilidade e especificidade, o ELISA r-p24 IgY demonstrou ser um teste capaz de distinguir animais falso positivos.

O MAPA preconiza que a estabilidade do produto deve ser comprovada por meio de testes de estabilidade de longa duração (teste de prateleira). Entretanto, por experiência prévia com estudos de estabilidade de outros produtos já desenvolvidos nos laboratórios de Bio-Manguinhos, foi demonstrada neste trabalho a manutenção da reatividade do antígeno, durante 12 meses, a 4°C e também nas diferentes condições de armazenamento como a 37°C e temperatura ambiente. De acordo com a norma ABNT NBR 14.864 (2002), o teste de estabilidade à temperatura ambiente é o teste de resistência e a estabilidade do *kit* aberto, a do *kit* em uso e à temperatura extremas, simulam o transporte e manuseio do *kit*. Os resultados apresentados no ELISA r-p24 IgY demonstraram que o uso dos estabilizadores, após a sensibilização da placa e na adição ao conjugado, preservou a atividade da proteína r-p24 e da IgY ligada à peroxidase. Os coeficientes de variação para a amostra de referência positiva foram 1,9% a 3,9% e para amostra de referência negativa foram 0,8% a 7,4%, no período de doze meses de avaliação. Conforme especificações do fabricante dos estabilizadores (Kem-En-Tec), ocorre uma queda da reatividade do anticorpo conjugado no primeiro mês de avaliação, quando mantido a 37°C e depois este mantém-se estável por 4 anos a 2-8°C. Esta queda foi observada na amostra de referência negativa no primeiro mês de avaliação quando atingiu o maior coeficiente de variação de 7,4%. De uma forma geral, o *kit* ELISA r-p24 IgY

apresentou-se dentro das especificações preconizadas pelo MAPA, com um coeficiente de variação inferior a 5% na avaliação da reatividade do *kit* durante o período de, no mínimo, doze meses.

Na **quinta etapa** deste trabalho realizou-se o estudo comparativo do desempenho do ELISA r-p24 IgY frente ao ELISA r-p24 IgG. Gutiérrez et al. (2007) demonstraram que os anticorpos da gema do ovo obtidos de galinhas imunizadas com IgG de camundongo podem ser uma alternativa aos de mamíferos (coelhos) após conjugação com a peroxidase. Os resultados encontrados por Gutiérrez et al. demonstraram que os conjugados obtidos a partir da IgY apresentaram características de precisão superior ao de coelhos, correspondendo a reações inespecíficas com coloração de fundo com menores valores. A conclusão dos autores foi que o conjugado IgY anti-IgG de camundongo alcança um rendimento 3 vezes superior quando comparado à anti-IgG de camundongo produzida em coelhos.

No nosso trabalho, a diferença nos testes ELISA r-p24 IgY em relação ao ELISA r-p24 IgG foi a origem da imunoglobulina anti-IgG de gato, aviária ou de mamíferos (coelho) conjugado à peroxidase. A avaliação foi realizada com 251 soros de gatos, sabidamente negativos e positivos no teste SNAP<sup>®</sup> FIV/FelV Combo. A comparação dos parâmetros de desempenho entre os testes demonstrou o melhor desempenho do ELISA, utilizando imunoglobulina aviária quando comparada ao ELISA empregando imunoglobulina de mamíferos (Tabela 5). Na realização dos testes foi observado um menor “*background*” no ELISA r-p24 IgY, corroborando, com os achados de Gutiérrez et al., (2007).

Do ponto de vista econômico, a IgY tem demonstrado ser a escolha ideal para a produção de anticorpos em grande escala. Dubie et al (2015) citam que o custo efetivo da produção de IgY é inferior a \$10/grama comparada a IgG, que pode chegar a \$ 20.000/ grama. Desta forma, a tecnologia IgY poderá contribuir para a redução dos custos dos imunodiagnósticos para uso em pesquisa ou na rotina clínica, permitindo novas aplicações da IgY, tanto na medicina humana quanto na veterinária.

O Brasil apresenta uma forte dependência tecnológica dos insumos e produtos no setor de imunodiagnóstico. Atualmente, o diagnóstico da FIV ainda não é amplamente realizado, uma vez que os testes diagnósticos disponíveis possuem alto custo por se tratarem de *kits* importados. A implementação da tecnologia IgY sobre a tradicional inclui:

- A redução do uso de animais devido a grande quantidade na produção de anticorpos pelas galinhas;
- A eliminação da dor e estresse na coleta de sangue dos animais;
- A utilização da IgY em diferentes testes imunológicos sem a perda da especificidade e sensibilidade;
- O custo consideravelmente menor na alimentação e manuseio das aves em relação aos mamíferos.

Neste trabalho, o bem-estar animal e a produção e purificação de anticorpos anti-IgG de gato de ovos de galinha foi promissora, fazendo com que a produção de outros anticorpos também possa ser avaliada pelo mesmo método. A utilização do esquema de imunização avaliado pode servir como modelo para a produção de IgY contra outros tipos de antígenos. O método de extração de lipídeos e a aplicação da molécula de PEG 6000 na gema pode ser utilizado em qualquer estudo. O domínio da tecnologia IgY poderá abrir campos para outras aplicações em áreas como o diagnóstico de doenças em medicina humana e veterinária. Também poderá contribuir com a pesquisa e o desenvolvimento de novos ensaios, atendendo às normas e diretrizes nacionais e internacionais, tanto de bem-estar animal como de validação, impulsionando o desenvolvimento nacional de *kits* diagnósticos de interesse em saúde humana ou animal.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ O antígeno recombinante p24 do FIV produzido em sistema procarioto seguido do processo de purificação adaptado à produção em larga escala permitiu a padronização do teste ELISA r-p24 IgY para o diagnóstico da infecção pelo FIV.
- ✓ A produção dos anticorpos IgY específicos para IgG de gato, utilizando aves poedeiras é uma tecnologia acessível.
- ✓ A IgY anti-IgG de gato é um insumo em potencial para ser utilizado como conjugado em um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico do FIV.
- ✓ O *kit* ELISA r-p24 IgY apresentou desempenho compatíveis aos critérios internacionais para a finalidade de diagnóstico para o FIV.
- ✓ O ELISA r-p24 IgY possui características desejáveis para uso comercial, tais como alta precisão e longo período de manutenção da reatividade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Methods*, v. 160, n. 2, p. 207-14, Apr 1993. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8459107>>.

ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 19, n. 3, p. 245-253, 2003.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - Diagnóstico in vitro - Procedimentos para validação de reagentes ou sistemas de diagnóstico. 2002. Disponível em: <http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=1903>.

BALLS, M.; VAN ZELLER, A.M; HALDER, M.,eds. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: Elsevier, p.1795 2000.

BARR, M.C.; PHILLIPS, T.R. VIF e Doença Relacionada. In: ETTINGER, S.J e FELDMAN, EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.90.p.456-462. 2008.

BEÇZKOWSKI P. Virus evolution in the progression of natural feline immunodeficiency virus infection. 2012. Disponível em: <<http://theses.gla.ac.uk/4186/>>.

BEHN I., HOMMEL U., OERTEL M. & HAUSCHILDT S. Kinetics of IgY formation after immunization of hens with different protein antigens. *ALTEX*, 13(5), 18-21, 1996.

BERGHMAN, L.R, ABI-GHANEM, D., WAGHELA, S.D. and RICKE, S.C. Antibodies. An alternative for antibiotics? 2005. *Poultry Science* 84: 660-666, 2005.

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

BIENZLE, D.; REGGETI, F.; WEN, X. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Canadian Veterinary Journal*, v. 45, n. 9, p. 753-757, 2004.

BIŽANOV, G.; VYSHNIAUSKIS, G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Veterinary Research Communications*, v.24, n.1, p.103-113, 2000.

BIŽANOV, G. AND JONAUSKIENĖ, I. Production and purification of igy from egg yolk after immunization of hens with pig igg. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 47, 403-410, 2003.

BIŽANOV G, JONAUSKIENE I, HAU J. A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. *J Lab Anim Sci*. 2004; 31(3): 121-130.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/Secretaria de Defesa Agropecuária/Instrução Normativa MAPA N° 13, de 03.10.03. 2003.

Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=830709255>>. Acesso em: 12 Jul 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/ INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 9 DE MAIO DE 2005. 2005. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1775629259>>.

BRASIL a, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/ Secretaria de Defesa Agropecuária/ Instrução Normativa SDA nº 4, de 19 de fevereiro de 2008. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=407472077>>. Acesso em: 12 Jul 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/Manual do Sistema Nacional de Informação Zoossanitária- SIZ.2013. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Manual%20SIZ/Manual\\_SIZ\\_09\\_12\\_2013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual%20SIZ/Manual_SIZ_09_12_2013.pdf)> Acesso em: 02 Jan 2015.

BRESOLIN, I.T.L., MIRANDA, E.A., BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. Quim. Nova, Vol. 32, No. 5, 1288-1296, 2009.

CAI, Y.C., GUO, J., CHEN, S.H., TIAN, L.G., STEINMANN, P., CHEN, M.X., LI, H., AI, L., CHEN, J.X. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. Parasitol Int 61, 385-390, 2012.

CALDAS, A. P. F.; LEAL, E. S.; SILVA, E. F. A. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, n. 1, p.20-25, 2000.

CAMARGO IF, GASPAR AM, YOSHIDA CF. Comparative ELISA reagents for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg). Mem Inst Oswaldo Cruz. Apr-Jun;82(2):181-7,1987.

CARLANDER D, STALBERG J, LARSSON A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. Ups J Med Sci.104 (3): 179-189, 1999.

CARLANDER, D., KOLLBERG H, WEJÅKER PE, LARSSON A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. Immunol Res, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000. ISSN 0257-277X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803878>>.

CARLANDER D. Avian IgY antibodies in vitro and in vivo [Dissertation]. [Sweden]: Uppsala university, 53p. 2002.

CARROL, S.B.; THALLEY, B.S.; THEAKSTON, R.D.G. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with comercial equine crotalid antivenoms. Toxicon, v.30, n.9; p.1017-1025, 1992.

CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strain from State of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 6, p. 1222-1225, 2006.

CRAWFORD, P. C., SLATER, M. R., LEVY, J. K. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 1503-7, 2005.

COOK M.E.; TROTT D.L. IgY – immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. *World's Poult. Sci. J.*, 66, 215-225, 2010.

COURCHAMP, F., YOCCOZ, N. G., ARTOIS, M., PONTIER D. At risk individual in feline immunodeficiency virus epidemiologic: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). *Epidemiology and Infection*, 121, 227 – 236, 1998.

DÁVALOS-PANTOJA L, ORTEGA-VINUESA JL, BASTOS-GONZÁLEZ D, HIDALGO-ALVAREZ RA. Comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J Biomater Sci Polym. Ed.*; 11(6): 657-673, 2000.

de PAULA, V. S., DA SILVA ADOS S, DE VASCONCELOS GA, IFF ET, SILVA ME, KAPPEL LA, CRUZ PB, PINTO MA. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *J Virol Methods*, v. 171, n. 1, p. 102-6, Jan 2011. ISSN 1879-0984. Disponível em : < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971134> >.

DIEHL, L. J.; HOOVER, E. A. Disease progression correlates with plasma viral-RNA load in an accelerated FIV model. *Aids Research and Human Retroviruses*, 11, S93-S93, 1995.

DINIZ, Rejane Silva- Validação de métodos laboratoriais aplicados ao diagnóstico de doenças dos animais. 2013. 83 p. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC-9P3PMB/teserejanasilvadiniz2013.pdf?sequence=1>>.

DUARTE, A.; TAVARES, L. Phylogenic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Veterinary Microbiology*, 114, 25 – 33, 2006.

DUARTE, A., GIL, S., LEAL, R.,TAVARES, L. Vírus da imunodeficiência felina (VIF): da etiologia às novas abordagens terapêuticas. *Medicina Veterinária*, 66, 37-43, 2012.

DUBIE,T; SISAY T., ZERU F.; GEBRU M., M.Y. The potential application of avian egg antibodies with emphasis on immunotherapeutic and immunodiagnostic purpose. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. May, Vol. 7, No. 5: 145-158, 2015. Disponível em:<[http://www.academicjournals.org/article/article1429100105\\_Dubie%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1429100105_Dubie%20et%20al.pdf)>.

European Advisory Board on Cat Diseases [ABCD] (2012). Guidelines: Feline Immunodeficiency. Disponível em: <<http://www.abcd-vets.org/Pages/Home.aspx>>.

FERREIRA, G. S., MASSON, G. C., GALVÃO, A. L.B., LÉGA, E. PINTO, M. L. Vírus da imunodeficiência felina: um desafio clínico. *Nucleus Animalium*, v.3,n.1,maio 2011.

FISHER, M; HLINAK, A. An ELISA for the quantification of chicken immunoglobulin (IgY) in various liquid media. ALTEX 13, Suppl. 1, 179-183, 1996.

FU CY, HUANG H, WANG XM, WANG XM, LIU YG, WANG ZG, CUI SJ, GAO HL, LI Z, LI JP, KONG XG. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. J Virol Methods. Apr;133(1):112-5, 2006.

GARDNER, I. A.; GREINER, M. Receiveroperating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. Vet. Clin. Pathol., v. 35, n. 1, p. 8-17, 2006.

GIL, S., LEAL, R., DUARTE, A., MCGAHIE, D., SEPÚLVEDA, N., SIBORRO, I., CRAVO, J., CARTAXEIRO, C., TAVARES, L. Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. Research in Veterinary Science, 94, 753 – 763, 2013.

GOLDRING, J. P.; COETZER, T. H. T. Isolation of chicken immunoglobulins (IgY) from egg yolk. Biochemistry and Molecular Biology Education, v.31, n.3, p.185-187, 2003.

GRACE, S. F. Feline immunodeficiency virus infection. In G. D. Norsworthy, M. A. Crystal, S. F. Grace, L. P. Tilley (Eds.), The Feline Patient (4th ed.). (pp. 179 – 180). Iowa, USA: Blackwell Science Ltda, 2011.

GREINER, M.; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Preventive Veterinary Medicine, v. 45, n.1-2, p. 3-22, 2000.

GUTIÉRREZ CALZADO, E.; GARCÍA GARRIDO, R. M.; SCHADE, R. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens. Altern Lab Anim, v. 29, n. 6, p. 717-26, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 02611929. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709045>>.

GUTIÉRREZ CALZADO EJ, SAMÓN CHÁVEZ T, SIERRA GONZÁLEZ G, HIGGINSON CLARKE D, RODRÍGUEZ SILVA G, SCHADE R. Desarrollo de un Sistema ELISA para cuantificar IgG de ratón tomando como base la Tecnología IgY. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 38(1):75, 2007.

HANSEN, P. SCOBLE, J.A., HANSON, B., HOOGENRAAD, N. J. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. Journal of Immunological Methods, v.215, n.1, p.1-7, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175998000507>>. doi: 10.1016/S0022-1759(98)00050-7.

HAYWARD, J. J.; RODRIGO, A. G. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 134, 68 – 74, 2010.

HAYWARD, J. J., TAYLOR, J., RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. Journal of Virology, p. 2999 – 3004, 2007.



HARDY, W. D.JR; MCCLELLAN, A. J. D, ZUCKERMAN, E. E., H.; SNYDER W. JR, MACEWEN, E. G., FRANCIS, D.and ESSEX, M. Development of virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV. *Nature* 288, 90 - 92 (06 November 1980); doi:10.1038/288090a0. Disponible em: <http://www.nature.com/nature/journal/v288/n5786/abs/288090a0.html>.

HARDY, W.D.Jr. General principles of retrovirus immunodetection tests. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, n.10, p.1282-1287, 1991.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Veterinary Journal*, v.155, n.2, p.123-137, 1998.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C.E.; VIDYASHANKAR, A.N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H.F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.9, n.6, p.439-445, 2007.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143, 190-201, 2011.

HATTA H, TSUDA K, AKACHI S, KIM M, YAMAMOTO T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem*. Mar;57(3):450-4, 1993.

HIGGINS, D. A., K. F. SHORTRIDGE, PL NG. Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*). II. Antibody response in influenza A virus infections. *Immunology*, v.62, p.499-504, 1988. Disponible em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1454141/>.

HILGERS, L. A. TH; NICOLAS, I.; LEJEUNE, G.; DEWIL, E.; BOON, B. Effect of various adjuvants on secondary immune response in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66:159-171, 1998.

HOHDATSU, T.; HIRABAYASHI, H.; MOTOKAWA, K.; KOYAMA, H. Comparative study of the cell tropism of feline immunodeficiency virus isolates of subtype A, B and D classified on the basis of the env gene V3-V5 sequence. *Journal General Virology*, v.77, p.93-100, 1996.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, v. 125, n. 11, p. 293-297, 1989.

HOSIE, M.J.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, n.7, p.575-584, 2009.

ICTVdB MANAGEMENT. 00.061.1.06. Lentivirus. In: *ICTVdB – The Universal Virus database*, version 4, 2006. Disponible em: [http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode\\_id=20025358](http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20025358).



INGREDIENTSINSIDE. Disponível em: <<http://www.ingredients-insight.com/contractors/other-ingredients/igy-nutrition/igy-nutrition4.html>> Extraída em 04 Out 2016.

JACOBSON, R.H. How well do serodiagnostic tests predict the infection or disease status of cats? J. Am. Vet. Med. Assoc., v.199, n.10, p.1343-1347, 1991.

JACOBSON, R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. Revue scientifique et technique-office International des Epizooties, v. 17, n.2, p. 469-526, 1998.

JENSEN, A.L.; KJELGAARD-HANSEN, M. Diagnostic test validation. In: Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. Schalm's veterinary hematology. 6. ed. Wiley-Blackwell, chap.130, p. 1027-1033, 2010.

JENSENIUS, J. C., ANDERSEN I., HAU J., CRONE M., KOCH C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods, v. 46, n. 1, p. 63-8, 1981. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169771>>.

JONES, G.L. HERBERT G.A., CHERRY W.B. Immunochemical Protocols Volume 295 of the series [Methods In Molecular Biology™](#) pp 227-253, 1978.

KLEMPERER, F. Über natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 31: 356-382, 1893.

KIM, H.O., DURANCE, T.D., LI-CHAN, E.C. Reusability of avidin-biotinylated immunoglobulin Y columns in immunoaffinity chromatography. Anal. Biochem. 268, 323-397, 1999.

KITAGUCHI, K., OSADA K, HORIO F, MURAI A. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. Vet Immunol Immunopathol, v. 121, n. 3-4, p. 290-9, Feb 2008. ISSN 0165-2427. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031828>>.

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

KO, K.Y.; AHN, D.U. Preparation of immunoglobulin y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Poultry Science, v.86, p.400-407, 2007. Disponível em: <<http://poultsci.highwire.org/content/86/2/400.full.pdf+html>>.

KOENEN, M. E.; BOONSTRA-BLOM, A. G.; JEURISSEN, S. H. M. Immunological differences between layer and broiler type chickens. Veterinary immunology and immunopathology, Amsterdam, v. 89, n. 5, p. 47-56, 2002.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian Poultry Biology Reviews*, 15: 25-46, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

LARA, V. M.; TANIWAKI, S. A.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Ciência Rural*, v. 38, n. 8, p. 2245-2249, 2008.

LARSSON, A., WEJÅKER PE, FORSBERG PO, LINDAHL T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J Immunol Methods*, v. 156, n. 1, p. 79-83, Nov 1992. ISSN 0022-1759. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431165>>.

LECOLLINET, S.; RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: The road not taken. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.31, p.167-190, 2008.

LESLIE GA, CLEM LW. Phylogen of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med*. 130(6): 1337-1352, 1969.

LÉVESQUE S, MARTINEZ G, FAIRBROTHER JMPS. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. *Poult Sci*, 86 (4): 630-635, 2007.

LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.228, n.3, p.371- 376, 2006.

MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MUIR, D. B. Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 30, n. 2, p.133-144, 1992.

MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P.; SCHATZMAYR, H.G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R.M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro. *Brazilian Journal Virology*, v.82, n.16, p.7863-7874, 2008.

MATHEIS, W; SCHADE, R. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. *J. Immunol. Methods*, v.369, n. 1-2, p. 125-132, 2011.

MAZUR C.; REIS J.K.P.; LEITE R.C.; DANELLI M.G.M.; HAGIWARA M.K.; MEDEIROS M.A. Evaluation of a recombinant p24 antigen for the detection of feline immunodeficiency virus-specific antibodies. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 10, p. 877-880, 2010.

MCCORMACK WT, TJOELKER LW, BARTH CF, CARLSON LM, PETRYNIAK B, HUMPHRIES EH, THOMPSON CB. Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes Dev.*, Jun;3(6):838-47,1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501152>>.

MCGINN, T.; WYER, P. C.; NEWMAN, T. B.; KEITZ, S.; LEIPZIG R.; GUYATT, G. Tips for learners of evidence-based medicine: 3. Measures of observer variability (kappa statistic). *Can. Med. Assoc. J.*, v. 171, n. 11, p. 1369-1373, 2004.

MEDEIROS Mauricio Z. Reagentes para Diagnóstico: Estratégias para a Produção e Desenvolvimento em Bio-Manguinhos. Mestrado Profissional [Dissertação em Gestão de C&T em Saúde] - Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro. 2004.

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

MICHAEL, A., S. MEENATCHISUNDARAM, G., PARAMESWARI, SUBBRAJ, T., SELVAKUMARAN, R., AND S. RAMALINGAM. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian Journal of Science and Technology* Vol. 3 No. 4 (Apr. 2010). Disponível em: <[file:///C:/Users/marli/Downloads/29741-29438-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/marli/Downloads/29741-29438-1-PB%20(1).pdf)>.

NAFEA, N.M. Isolation, purification and conjugation of polyclonal antibodies type Y from immunized hens against hepatitis B surface antigen. Dissertação, 2008. University Bagdad. Disponível em: <<https://www.scbaghdad.edu.iq/library/Biology/MS.C/2012/isolation,purification%20and%20conjugation%20of%20polyclonal.pdf>>.

NAKAMURA, K.; SUZUKI, Y.; IKEO, K.; IKEDA, Y.; SATO, E.; NGUYEN, N.T.; GOJOBORI, T.; MIKAMI, T.; MIYAZAWA, T. Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Archives of Virology*, v.148, n.4, p.789-791, 2003.

NAKANE P.K.; KAWOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Journal Histochemistry Cytochemistry*. v.22, n.12, p.1084-1091, 1974.

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

O'BRIEN SJ, TROYER JL, BROWN MA, JOHNSON WE, ANTUNES A, ROELKE ME, JILL PECON-SLATTERY. Emerging viruses in the Felidae: shifting paradigms. *Viruses*. 2012;4:236–57. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315214/>>.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). World Organisation for Animal Health. 2014. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.6.01\\_ANTIBODY\\_DETECT.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf)>.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) a. World Organisation for Animal Health. 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/>>.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) a. World Organisation for Animal Health. 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>> .

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) b. World Organisation for Animal Health. 2016. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf)>.

O'KEEFE, E. P. Nucleic acid delivery: Lentiviral and retroviral vectors. 2013. Disponível em: <<http://www.labome.com/method/Nucleic-Acid-Delivery-Lentiviral-and-Retroviral-Vectors.html>>.

O'NEIL LL, BURKHARD MJ, HOOVER EA: Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 10(4):266-278, 1995.

PAULY D, DORNER M, ZHANG X, HILINAK A, DORNER B, SCHADE R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult Sci.* 88(2): 281-90, 2009.

PAULY D, CHACANA PA, CALZADO EG, BREMBS B, SCHADE R). IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J. Vis. Exp.* (51):e3084, 2011. doi:10.3791/3084.

PECORARO, M.R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M.E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *Journal General Virology*, v.77, p. 2031-2035, 1996.

PEDERSEN, N.C.; HO, E.W.; BROWN, M.L.; YAMAMOTO, J.K. Isolation of a T-lymphotropic vírus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*, 235, 790–793, 1987.

PEDERSEN, N.C.; BARLOUGH, J.E. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 199, n.10, p.1298-1305, 1991.

POLSON A, VON WECHMAR MB, VAN REGENMORTEL MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun.* 9: 475-493, 1980.

RANGEL, M.F.N., LEMOS L S; ALMEIDA C M C; SALES L G; VIEIRA-DA-MOTTA O. Development of IgY antibodies in chickens and IgG in rabbits immunized against proteins of *Phytium insidiosum* isolated from horses in the state of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.1, p.87-93, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2010000100014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000100014)>. doi: 10.1590/S0100-736X2010000100014.

RECHE, J. R. A; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 34, p. 152-155, 1997.

ROCHA, D. G. Isolamento Transcriptômico das sequências variáveis de IgY de galinhas poedeiras (*Gallus gallus*) antivenenos de *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus*. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

ROSE, M.E.; ORLANS, E.; BUTTREZ, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology*, v.4, p.521-523, 1974. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830040715/pdf>>. doi: 10.1002/eji.1830040715.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: <[http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc)>.

SANTOS, FN. Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2012. 98 f. Tese Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro. Disponível em: <[bvssp.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=3856](http://bvssp.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=3856)>.

SANTOS, F.N., BRUM, B.C., CRUZ, P.B., MOLINARO, C.M., SILVA, V.L., CHAVES, S.A.M. Production and Characterization of IgY against Canine IgG: Prospect of a New Tool for the Immunodiagnostic of Canine Diseases. *Braz. Arch. Biol. Technol.* vol.57 no.4 Curitiba July/Aug. 2014. Disponível em: <<<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132014005000020>>>.

SCHADE R, BURGER W, SCHONEBERG T, et al. Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *ALTEX*, 11(2):75-84, 1994.

SCHADE R, HILINAK A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX*, 13 (5): 5-9, 1996.

SCHADE R, BEHN I, ERHARD M, HILINAK A, STAAK C. Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology. 1º ed. Germany: Slevy pringer; 2000. 249 p.

SCHADE, R., CALZADO EG, SARMIENTO R, CHACANA PA, PORANKIEWICZ-ASPLUND J, TERZOLO HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*, v. 33, n. 2, p. 129-54, Apr 2005. ISSN 0261-1929. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180988>>.

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity of Different Methods for the Extraction and Purification of IgY. *ALTEX*, v. 13, n. 5, p. 35-39, 1996. ISSN 1868-596X.

SCHWARZKOPF, C., STAAK C., BEHN I. & ERHARD M. Immunisation. In: SCHADE, R., BEHN, I., ERHARD, M., HLINAK, A., STAAK, C., eds. Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY Technology. Berlin; Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 25-64, 2001.

SELLON, R.K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In: GREENE, C.E. Infectious disease of the dog and cat. 3.ed. Georgia: Elsevier, chap.14, p.131-143, 2006.

SELLON, R. K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In C.E. Greene (ed.) Infectious Diseases of the Dog and Cat. (4th ed.). (pp.136 - 149). United States of America: Elsevier, 2012.

SHIMIZU M, NAKAI S, FITZSIMMONS RC. An-E.coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. J. Food Sci. 5: 1360-1366, 1988.

SHIMIZU M, NAGASHIMA H, SANO K, et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. Biosci Biotechnol Biochem. Feb;56(2):270-4, 1992.

SHIMIZU M, NAGASHIMA H, HASHIMOTO K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. Comp. Biochem PhysiolB.; 106(2): 255-261,1993.

SHIMIZU M, NAGASHIMA H, HASHIMOTO K, SUZUKI T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. J Food Sci. 59(4): 763-772, 1994.

SHIN JH, YANG M, NAM SW, KIM JT, MYUNG NH, BANG WG, ROE IH. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection. Clin Diagn Lab Immunol. Sep;9(5):1061-6, 2002.

SILVA, A DOS S, VASCONCELOS G.A, KAPPEL L.A, PINTO M.A, PAULA V.S. An immunoenzymatic assay for the diagnosis of hepatitis A utilising immunoglobulin Y. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 107, n. 7, p. 960-3, Nov 2012. ISSN 16788060. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147158>>.

SINGHA H, MALIK P, GOYAL SK, KHURANA SK, MUKHOPADHYAY C, ESHWARA VK, SINGH RK. Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines. Scientific World Journal. 2014 Feb 3;2014:469407. doi: 10.1155/2014/469407.

SPILLNER, E., BRAREN, I., GREUNKE, K., SEISMANN, H., BLANK, S., PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. Biologicals, v.40, n.5, p.313-322, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105612000759>>.

STAAK, C., 2001. Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY technology. Berlin. Springer, p.65-10.



STALBERG J AND LARSSON A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods; Ups. J. Med. Sci. 106 99-110, 2001.

STEINRIGL, A.; ERTL, R.; LANGBEIN, I.; KLEIN, D. Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to Central Europe and identifies diverse variants of clade B. Veterinary Immunology and Immunopathology, 134, 82 – 89, 2010.

SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. Rapid Commun Mass Spectrom, v. 15, n. 9, p. 708-12,2001. ISSN 09514198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319793> >.

SYKES, J. E. Feline immunodeficiency virus infection. In J. E. Sykes (ed.) Canine and Feline Infectious Diseases. (1rd ed.). (pp. 209 – 223). Missouri: Elsevier. 2013.

TAN, S.H.; MOHAMEDALI, A.; KAPUR, A.; LUKJANENKO, L.; , M.S. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. Journal of Immunological Methods, v.380, n.1-2, p.73-76, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175912000804>>.

TANABLE, T.; YAMAMOTO, J.K.; 2001. Phenotypic and Functional Characteristics of FIV Infection in the Bone Marrow Stroma In: Virology, 282: 113-122. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>.

TEIXEIRA, B.M.; LOGAN, N.; CRUZ, J.C.M.; REIS, J.K.P.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; HAGIWARA, M.K.; WILLETT, B.J.; HOSIE, M.J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus., Archives Virology, v.155, n.3, p.379-384, 2010.

TIZARD, I. The Avian Antibody Response. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. 2002; 11 (1): 2-14.

VASCONCELOS, GENTIL A. L. B. MENDONÇA. Anticorpos IgY específicos para o rotavírus do grupo A. Uma abordagem terapêutica para rotavirose em Macaca fascicularis. 2015. 138 f. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro.

VEERASAMI M, SINGANALLUR NB, THIRUMENI N, RANA SK, SHANMUGHAM R, PONSEKARAN S, MUTHUKRISHNAN M, VILLUPPANOOR SA. Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. New Microbiol. Oct;31(4):549-54, 2008.

WANKE, R.; SCHMIDT, P.; ERHARD, M.H.; SPRICK-SANJOSE, M.A.; STANGASSINGER, M.; SCHMAHL, W.; HERMANN, W. Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction. Zent. Veterinarmed A, 43(4), 243-253, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8767734> >.

WARD , W.W. & SWIATEK G. Protein Purification. Current Analytical Chemistry, 2009; 15734110/09.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today, v. 16, n. 8, p. 392-8, Aug 1995. ISSN 0167-5699. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546196> >.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unraveling feline immunodeficiency virus infection. Veterinary Immunology and Immunopathology, 123 (1-2), 56-64, 2008.

WILLETT, B. Genome structure of FIV based on available data 2013. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24877436>>.

WOOLLEY J.A., LANDON J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. J Immunol Methods.1995; 178 (2): 253-265. World Health Organization. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/119464/1/10\\_4-5\\_2004\\_655\\_662.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/119464/1/10_4-5_2004_655_662.pdf?ua=1)>

WRIGHT P.F.; NILSSON E.; VAN ROOIJ E.M.A.; LELENTA M.; JEGGO M.H. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. In Biotechnology applied to the diagnosis of animal diseases. Revue scientifique et technique-office International des Epizooties, 12 (2), 435-450,1993.

YAMAMOTO, J.K., SPARGER, E., HO, E.W., ANDERSEN, P.R., O'CONNOR, P., MANDELL, C.P., LOWENSTINE, L., MUNN, R. & PEDERSEN, N.C. The pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats. American Journal of Veterinary Research, 49, 1246-1258,1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2459996>>.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 194, n. 2, p. 213-220, 1989.