

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária



**Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A
purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível
aplicação em diagnóstico do vírus no fígado**

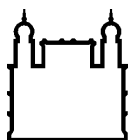
GENTIL ARTHUR LINS BENTES MENDONÇA DE VASCONCELOS

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos

Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Rio de Janeiro
2010

Ficha Catalográfica

V331

Vasconcelos, Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de.

Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado / Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos. – Rio de Janeiro, 2010.

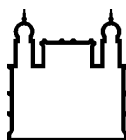
xvii, 104 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Parasitária, 2010.

Bibliografia: f. 65-85

1. Imunoglobulina Y. 2. Hepatite A. 3. CpG-ODN. 4. Adjuvante incompleto de Freund. I. Título.

CDD 571 967



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: *Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos*

Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: 31/03/2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado
FIOCRUZ/IOC

Prof^a. Dr^a. Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza
FIOCRUZ/BIOMANGUINHOS

Prof^a. Dr^a. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão
UFF

Aos meus queridos Pais,

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes para que eu pudesse chegar a este dia, meus Pais. Muitas pessoas participaram da construção desta dissertação, mas ninguém foi mais importante que minha mãe e meu pai. Com certeza estes são os responsáveis por qualquer conquista em minha vida! Estão e sempre estiveram presentes ao meu lado incondicionalmente. Por isso, sempre dedicarei todas as minhas conquistas a eles.

Mãe e Pai, muito obrigado por serem meus pais!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Marcelo Alves Pinto por aceitar orientar essa dissertação de mestrado e pelos ensinamentos nesses dois anos de projeto. Mesmo com pouco tempo disponível, como todo chefe de laboratório, sempre foi muito solícito em todos os momentos que precisei de ajuda.

Agradeço também a Dra. Vanessa Salete de Paula que apesar de não ser minha orientadora no papel por questões burocráticas, eu a considero minha orientadora também, uma vez que faz parte do trabalho e participou de todas as etapas. Pelos mesmos motivos tenho que agradecer também ao meu colega de projeto, Alexandre, que apesar de algumas divergências, muito natural quando duas pessoas trabalham juntas, foi muito parceiro em todo o projeto. Sem os dois, com certeza não teria conseguido concluir essa dissertação.

O ambiente de trabalho é muito importante para a execução de um bom trabalho, e neste quesito eu não tenho do que reclamar. Estendo o agradecimento a todos os colegas de laboratório: Amanda, Luciane, Livia, Tamara, Anna Carolina, Débora, Matheus, Lilian, Renata, Dani, Alyne, Tatiana Prado, Juliana Melgaço e Gabriel Natal. O pessoal do Laboratório de Virologia Comparada também deve ser lembrado, são grandes colegas de trabalho, mas não vou citar nomes, pois o laboratório é enorme e para eu esquecer o nome de alguém não custa, o que não seria nada legal. Citarei somente o Dr. Eduardo Melo Volotão, que sempre me quebrou vários galhos e tirou muitas dúvidas.

O meu agradecimento mais especial vai para a minha namorada, Juliana, que me apoiou bastante neste trabalho e esteve sempre ao meu lado, literalmente, pois também é uma companheira de laboratório. Ju, muito obrigado por estar ao meu lado neste momento.

Agradeço também aos pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar, Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira e Dra. Cláudia Lamarca Vitral.

Não posso me esquecer de pessoas que ajudaram muito no apoio da realização das técnicas, eles são essenciais para realização de qualquer trabalho. Dentre essas pessoas estão Pedro Paulo e Bernardo da Plataforma de Microscopia

Confocal, que além de analisar as lâminas ainda davam bons conselhos para a melhora da imunofluorescência, dos quais muitos foram importantes. Agradeço também a Paula e Messias, que sempre ajudaram muito nos experimentos em qualquer coisa que precisasse, sempre estenderam a mão para solucionar os problemas de protocolo que apareciam. Não posso esquecer-me do Luis do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo que me ensinou a fazer os cortes no criostato e sempre que precisei viabilizou a utilização do aparelho. Outro laboratório a ser agradecido é o Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses pelo uso do microscópio de fluorescência. Todos foram fundamentais!

Gostaria de agradecer ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão, Dra. Cláudia Lamarca Vitral e Dra. Elzinandes Leal de Azeredo que aceitaram participar da banca de avaliação desta dissertação.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da Biologia Parasitária e ao Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade dada a mim de realizar esse mestrado, e ao CNPq pela bolsa concedida.

Meu muito obrigado à Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO) por nos ceder o Laboratório de Bioclimatização para acomodação das galinhas e a realização dos experimentos necessários.

Nesses agradecimentos não poderia esquecer meus amigos de longa data e meu irmão, que com certeza também é meu amigo. Apesar de entenderem muito pouco ou nada do que faço, tenho certeza que torcem por mim. Gabriel, André, Danilo, Tiago, Samuel, Márcio e Henrique, obrigado pela amizade.

Agradeço também aos meus colegas de turma da Biologia Parasitária pela amizade e alegria de todos.

Bom, são muitas pessoas a agradecer, foram dois anos de muito trabalho e com certeza estou esquecendo algumas pessoas, mas não se sintam de lado, com certeza todos que estavam próximos foram importantes para essa dissertação. Sintam-se sempre abraçados pelos meus agradecimentos!

“O único lugar onde sucesso vem antes
do trabalho é no dicionário.”

(Albert Einstein)

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso
sem perder o entusiasmo.”

(Winston Churchill)

RESUMO

O interesse da literatura científica pela imunoglobulina Y (IgY) é crescente devido a várias vantagens tais como: fácil obtenção, baixo custo, produção em larga escala e método mais adequado quanto ao aspecto bioético. A IgY está presente em aves e répteis, sendo transferida do soro para a gema dos ovos desses animais através de processo secretório. A produção de imunoglobulina IgY específica contra o vírus da hepatite A se justifica na detecção do vírus da Hepatite A (HAV) em tecido hepático em casos de hepatite fulminante sem diagnóstico definido, em ensaios experimentais para preparação de novas vacinas para hepatite A e a possibilidade de emprego como imunoterapia na prevenção da hepatite aguda pós-exposição ao vírus. Cabe ressaltar que anticorpos anti-HAV atualmente comercializados têm baixa afinidade e têm custo elevado. Nosso estudo consistiu em produzir anticorpos específicos anti-HAV em frangas ISA Brown imunizadas e avaliar seu uso no diagnóstico da hepatite A em tecido. METODOLOGIA: Vinte galinhas divididas em cinco grupos (I-V) foram imunizadas com os seguintes inóculos: Grupo I – Vacina comercial contra hepatite A e Oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfatoguanosina (CpG-ODN); Grupo II – Vacina comercial contra hepatite A; Grupo III – Vírus da Hepatite A, adjuvante incompleto de Freund (IFA) e CpG-ODN; Grupo IV – Vírus da Hepatite A e IFA; Grupo V – IFA (controle). Os ovos foram coletados e purificados pelo método de precipitação em polietileno glicol (PEG). A IgY foi caracterizada e quantificada pelos métodos de ELISA, neutralização *in vitro*, eletroforese e “Western Blotting”. A detecção do HAV em fígado foi realizada pelo método de imunofluorescência indireta (IIF) com a IgY anti-HAV sendo utilizada como anticorpo primário e IgG de cabra anti-IgY marcada com Alexa Fluor® 488 como anticorpo secundário. Para isto utilizamos amostras de fígado de primatas não-humanos (macacos cynomolgus) infectados e não infectados com HAV, uma amostra humana com hepatite fulminante de etiologia viral por hepatite A e uma amostra humana com hepatite fulminante de etiologia não viral (controle). Os anticorpos primários (IgY) utilizados foram purificados dos ovos dos grupos I e III, e o anticorpo do Grupo V foi utilizado como controle. RESULTADOS E DISCUSSÃO: Todas as aves imunizadas com antígeno HAV soro-converteram, e os anticorpos IgY anti-HAV foram efetivamente transferidos para a gema dos ovos tendo a associação dos adjuvantes IFA mais CPG-ODN se mostrado mais efetiva. Os métodos de caracterização da IgY demonstraram especificidade ao antígeno HAV, contudo o diagnóstico tecidual pela técnica da IIF apresentou excessiva marcação inespecífica, necessitando de aprimoramento na técnica de purificação da imunoglobulina para uso nesta finalidade.

ABSTRACT

Immunoglobulin Y (IgY) is found in birds and reptiles, currently used by the advantage of being transported from serum to the yolk of eggs of these animals. This protein is purified from egg yolk of immunized birds with a specific antigen, and the IgY easily accessible and has bioethical character, because the animals do not suffer any injury. Besides low cost, the amount of immunoglobulin produced by animals is very high, accounting for five to ten times the average annual production of IgG in rabbits. Moreover, the conserved mammalian proteins are often more immunogenic in birds than in mammals. Detection of Hepatitis A Virus (HAV) in liver tissue is important in cases of acute liver failure to precisely diagnose the cause of liver failure, in clinical trials to test a new vaccine for hepatitis A, and the possibility of employment as immunotherapy in the prevention of acute hepatitis after exposure to the virus. The anti-HAV antibodies currently marketed have low affinity and have high cost. Our study aims to produce specific anti-HAV in laying hens immunized for detection of HAV in liver. METHODS: Twenty chickens divided into five groups (I-V) were immunized with the following schedule: Group I - commercial vaccine against hepatitis A and C-phosphate-guanosine-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN); Group II - commercial vaccine against hepatitis A; Group III - HAV, Freund's incomplete adjuvant (IFA) and CpG-ODN; Group IV - HAV and IFA; Group V - IFA (control). The eggs were collected and purified by the method of precipitation in polyethylene glycol (PEG). The IgY was characterized and quantified by ELISA, neutralization, electrophoresis and Western blotting. The detection of HAV in liver were analyzed by indirect immunofluorescence (IIF) with IgY anti-HAV was used as primary antibody and goat IgG anti-IgY labeled with Alexa Fluor[®] 488 as secondary antibody. We used samples of liver non-human primates (cynomolgus monkeys) infected and not infected with HAV, a human sample with fulminant hepatitis of viral hepatitis A and a human sample with fulminant hepatitis without viral etiology (control). The primary antibodies (IgY) used were purified from eggs of groups I and III, and the antibody of the Group V was used as control. RESULTS AND DISCUSSION: All immunized chickens were seroconvert, except the birds in the control group, and the protein purified from egg yolk IgY was the anti-HAV. All tissue sections showed staining with IgY anti-HAV independent of the liver is infected or not, while control IgY did not show labeling. In all immunofluorescence was background. The IgY group I had better results than group III, having less unspecific binding. These results demonstrate that the antibody produced is really specific for hepatitis A virus and after that the technique can be standardized, it can be used for the immunofluorescence detection of the virus in sections of liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática da IgY de aves e da IgG de mamíferos.....	5
Figura 1.2 – Ovário de franga.....	9
Figura 1.3 – Ilustração esquemática do transporte seletivo no folículo ovariano aviário.....	11
Figura 1.4 – Organização do genoma do HAV, processamento da poliproteína, proteínas estruturais e não-estruturais maduras.....	18
Figura 1.5 – Fases clínicas e marcadores séricos da infecção.....	23
Figura 1.6 - Distribuição geográfica da infecção pelo HAV.....	27
Figura 3.1 – Esquema representativo da primeira etapa de centrifugação.....	35
Figura 3.2 – Esquema de ligação da IgY ao tecido hepático e ligação com anticorpo secundário fluorescente.....	39
Figura 4.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da IgY.....	45
Figura 4.2 – “Western Blotting” da IgY.....	46
Figura 4.3 – Imunofluorescência indireta 1.....	47
Figura 4.4 – Imunofluorescência indireta 2.....	49
Figura 4.5 – Imunofluorescência indireta 3.....	50
Figura 4.6 – Imunofluorescência indireta 4.....	52
Figura 4.7 – Imunofluorescência indireta 5.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Esquema de imunização de cada grupo.....	32
Tabela 3.2 – Amostras de fígado de indivíduos com diagnóstico previamente conhecido utilizadas para testar os anticorpos IgY anti-HAV na detecção do antígeno através da técnica de imunofluorescência indireta.....	38
Tabela 4.1 – Média do peso corporal das aves após cada imunização.....	40
Tabela 4.2 – Teste de neutralização do HAV com IgY anti-HAV e número de cópias do HAV detectadas na replicação.....	44
Tabela 4.3 – Diluições do anticorpo primário de 1:50 a 1:300 e do secundário de 1:700.....	47
Tabela 4.4 - Diluição do anticorpo primário de 1:200 e diluições do anticorpo secundário de 1:800 e 1:900.....	48
Tabela 4.5 – Diluição do primário de 1:200 e diluições do anticorpo secundário de 1:1.000 a 1:2.000.....	50
Tabela 4.6 – Diluição do primário de 1:200 a 1:5.000 e diluição do anticorpo secundário de 1:1.200.....	51
Tabela 4.7 – Diluição do anticorpo primário de 1:25 a 1:300 e diluição do anticorpo secundário de 1:1.200.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1 – Produção de anticorpos anti-HAV nos diferentes grupos imunizados..... 41

Gráfico 4.2 – Concentração das proteínas totais purificadas da gema em cada grupo nas 16 semanas de avaliação..... 42

Gráfico 4.3 – Concentração média por semana das proteínas totais purificadas na gema em cada grupo..... 43

Gráfico 4.4 – Titulação da IgY purificada da gema dos grupos ao longo das semanas..... 44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALF – Insuficiência hepática aguda
ALT - Alanina aminotransferase
BG – “Background”
BSA – Albumina de soro bovino
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CETA - Comitê de Ética no Trato com Animais
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CDC – Do termo inglês *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CFA – Adjuvante completo de Freund
CO – “Cut-off”
CO₂ – Dióxido de carbono
CoCl₂ – Cloreto de cobalto
CpG-ODN - Oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfato-guanosina
DAB - 3,3'-diaminobenzidina
DMSO – Dimetilsulfóxido
OD – Densidade ótica
DP – Desvio Padrão
μL - microlitro
DAB - 3,3'-diaminobenzidine
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DHBV – Vírus da hepatite B de patos
ELISA – Do termo inglês *enzyme-linked immunosorbent assay* (teste imunoenzimático)
FcRY – Receptor Fc da gema do ovo
FR – Fator reumatóide
FRhK-4 – Células de rim de macacos rhesus
g – grama
g – Força G
HAV – Vírus da hepatite A
HBV – Vírus da hepatite B
HCV – Vírus da hepatite C
HDV – Vírus da hepatite D
HEV – Vírus da hepatite E
HF – Hepatite Fulminante
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HAMA – Anticorpos anti-mouse produzidos em humanos
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HPV – Papilomavírus Humano
IFA – Adjuvante incompleto de Freund
IgA – Imunoglobulina A
IgD – Imunoglobulina D
IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M
 IgY – Imunoglobulina Y
 IIF – Imunofluorescência indireta
 kb - Kilobase
 kDa – KiloDalton
 LDL – Lipoproteína de baixa densidade
 LPS – Lipopolissacarídeo
 mAb – Anticorpo monoclonal murino
 mL - Mililitro
 mg - Miligrama
 mL – Mililitro
 MT – Marcação no tecido
 NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
 NCR – Região não-codificante
 nm – Nanômetro
 NR – Não realizado
 OMS – Organização Mundial de Saúde
 ORF – Área Aberta de Leitura
 PBS – Tampão fosfato salina
 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
 PEG – Polietileno glicol
 pH – Potencial hidrogeniônico
 PAMP – Padrões moleculares associados à patógenos
 PRR – Receptores reconhecedores de padrões
 RFLP - Polimorfismo de tamanhos de fragmentos gerados por enzimas de restrição
 RNA – Ácido ribonucléico
 RT-PCR – Transcrição reversa-PCR
 SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave
 SDS-PAGE – Do termo inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
 (gel de poliácridamida com dodecilsulfato de sódio)
 SFB – Soro fetal bovino
 SNC – Soro normal de cabra
 SSCP - polimorfismo conformacional da fita única
 q.s.p. - quantidade suficiente para
 TLR – Receptor “Toll-like”
 TMB - 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
 UNIFESO - Centro Universitário Serra dos Órgãos
 V - Volt
 VPg – Proteína do vírion ligada ao genoma
 µL – Microlitro
 µm - Micrometro

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Imunoglobulina Y</i>	1
1.1.1. Histórico	1
1.1.2. A Imunoglobulina Y	2
1.1.3. Rendimento	3
1.1.4. Propriedades moleculares da IgY	4
1.1.4.1. Estrutura	4
1.1.4.2. Estabilidade	6
1.1.5. Conteúdo da gema	7
1.1.6. Transferência da IgY para gema do ovo	8
1.1.7. Produção da IgY	11
1.1.7.1. Adjuvante	12
1.1.7.2. Via de inoculação	13
1.1.7.3. Purificação	13
1.1.8. Aplicação	14
1.2. <i>Vírus da hepatite A</i>	16
1.2.1. Histórico	16
1.2.2. O vírus	17
1.2.3. Organização genômica	17
1.2.4. Proteínas	18
1.2.5. Diversidade genética do HAV	19
1.2.6. Sorotipo e antigenicidade	19
1.2.7. Características Clínicas	20
1.2.7.1. Hepatite Fulminante	21
1.2.8. Patogenia e história natural da infecção	21
1.2.9. Diagnóstico	24
1.2.9.1. Detecção de anticorpos HAV-específicos	24
1.2.9.2. Detecção de antígenos	24
1.2.10. Epidemiologia	25
1.2.11. Prevenção	27
1.3. <i>Justificativa</i>	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	30
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	30

3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. <i>Acomodação, alimentação e procedimentos com os animais</i>	31
3.2. <i>Desenho experimental</i>	32
3.3. <i>Produção do vírus da hepatite A.....</i>	32
3.3.1. <i>Cultura de células FRhK-4</i>	32
3.3.2. <i>Propagação e liberação do vírus da hepatite A</i>	33
3.4. <i>Sorologia das aves</i>	33
3.5. <i>Método de purificação da IgY</i>	34
3.6. <i>Quantificação da IgY</i>	35
3.6.1. <i>Espectrofotometria</i>	35
3.6.2. <i>Titulação</i>	35
3.6.3. <i>Neutralização in vitro do HAV pela IgY da gema.....</i>	36
3.7. <i>Caracterização da IgY pela eletroforese (SDS-PAGE) e “Western Blotting”</i>	36
3.8. <i>Deteção de hepatite A em tecido</i>	37
3.9. <i>Análise estatística</i>	39
 4. RESULTADOS	 40
4.1. <i>Efeitos da imunização na biologia das frangas ISA Brown</i>	40
4.2. <i>Caracterização da IgY anti-HAV específica no soro e na gema.....</i>	41
4.2.1. <i>Deteção de anticorpo anti-HAV no soro.....</i>	41
4.2.2. <i>Espectrofotometria das proteínas totais.....</i>	42
4.2.3. <i>Título da IgY anti-HAV</i>	43
4.2.4. <i>Neutralização</i>	44
4.2.5. <i>Eletroforese e “Western Blotting”</i>	45
4.3. <i>Deteção do HAV em tecido de fígado.....</i>	46
4.3.1. <i>Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando IgY do grupo III</i>	46
4.3.2. <i>Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando IgY do grupo I.....</i>	53
 5. DISCUSSÃO.....	 55
 6. CONCLUSÕES.....	 64
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 65
 8. ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética (Infecção Experimental)	 86
 9. ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética (Hepatite Fulminante).....	 87
 10. ANEXO III – Artigo submetido à publicação.....	 90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Imunoglobulina Y

1.1.1. Histórico

Uma das principais necessidades da saúde pública é a geração de anticorpos específicos a antígenos de forma rápida, não-invasiva e com elevada relação custo-benefício, que possam ser aplicados amplamente no diagnóstico, em imunoterapia e na pesquisa em saúde pública (Stockwin *et al.*, 2003a, 2003b). Atualmente, os modelos animais mais escolhidos para produção de anticorpos monoclonal e policlonal são os mamíferos, principalmente lagomorfos e roedores. Nestes animais, a produção envolve duas etapas que causam estresse nos animais: a imunização e as repetidas sangrias ou eutanásia para esplenectomia, que são pré-requisitos para a preparação dos anticorpos monoclonais (Chalghoumi *et al.*, 2009b).

Em 1893, Klemperer demonstrou que a imunização de uma ave resultou na transferência de anticorpos específicos do soro para a gema do ovo. Por mais de cem anos, essa propriedade não foi utilizada cientificamente, mas a partir do momento que o bem-estar animal tornou-se prioridade no meio científico, os resultados de Klemperer atraíram uma grande atenção, especialmente a partir dos anos 1980.

Justifica-se portanto o uso de frangas poedeiras no processo de produção de anticorpos policlonais pela deposição dos mesmos na gema do ovo, fato que descarta a necessidade de procedimentos invasivos e dolorosos que envolvem a obtenção dos anticorpos séricos. Quanto ao rendimento, o emprego desta metodologia implica na redução no número de animais usados, pois a produção dos anticorpos nas aves poedeiras é quase dez vezes maior que em coelhos (Svendsen *et al.*, 1996). A denominação IgY tem origem da expressão inglesa “egg yolk immunoglobulin” que em português significa “anticorpo da gema de ovo” segundo Klemperer (1893).

1.1.2. A Imunoglobulina Y

A imunoglobulina Y (IgY) é isolada da gema do ovo de alguns vertebrados tais como aves e répteis (Leslie *et al.*, 1969; Hadge *et al.*, 1984), foi descrita pela primeira vez por Leslie *et al.* (1969), e representa a principal imunoglobulina presente no soro desses animais (Sun *et al.*, 2001). A mesma difere estruturalmente da IgG de mamíferos, e está presente no soro e na gema do ovo das aves, tendo concentração maior na gema que no soro (Rose *et al.*, 1974; Larsson *et al.*, 1993).

Como descrito há mais de cem anos atrás, aves têm a capacidade de transferir anticorpos maternos do soro para a gema do ovo com o objetivo de conferir imunidade passiva para o embrião e para o neonato (Klempner, 1893). De acordo com a literatura, a tecnologia de IgY (Fischer *et al.*, 1996) oferece muitas vantagens: (i) não há sangria do animal, pois somente a coleta dos ovos é necessária após a imunização; (ii) o isolamento da IgY é rápido e simples; (iii) pequenas quantidades de antígeno são requeridas para obter altos e duradouros títulos de IgY da gema do ovo de aves imunizadas; e (iv) a manutenção das aves é barata (Gottstein *et al.*, 1985; Gassmann *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1996; Schade *et al.*, 1996; Tini *et al.*, 2002).

É importante afirmar que proteínas conservadas de mamíferos exibem elevado grau de imunogenicidade nas aves, justificada pela grande distância filogenética, gerando anticorpos com alta avidéz e baixa reação cruzada a proteínas humanas (Jensenius *et al.*, 1981; Löscher *et al.*, 1986; Stuart *et al.*, 1988; Gassmann *et al.*, 1990; Larsson *et al.*, 1990, 1991, 1993; Ermeling *et al.*, 1992; Rosol *et al.*, 1993; Svendsen *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1996; Schade *et al.*, 1996; Tini *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). Isto confere maior imunogenicidade a proteínas não habitualmente presentes em aves.

Outra característica desejável é a região Fc da IgY que não se liga a receptores Fc de mamíferos, não ativando o sistema complemento, ou interagindo com fator reumatóide (FR) e anticorpos anti-mouse produzidos em humanos (HAMA), aumentando assim significativamente a especificidade da IgY como anticorpo de captura, o que possibilita a diminuição de resultados falso positivos quando empregados em testes de diagnóstico ou mesmo seu emprego na citometria de fluxo (Boscato *et al.*, 1988; Larsson *et al.*, 1991, 1992, 1993; Akita *et al.*, 1993; Warr *et al.*, 1995; Carlander *et al.*, 2000; Davalos-Pantoja *et al.*, 2000; Tini *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). Anticorpos heterofílicos tais como fatores reumatóides e

HAMA são reconhecidos em sua maioria pela baixa afinidade, frequentemente o isotipo IgM gera sinais não-específicos pela ligação a anticorpos de detecção (Greunke *et al.*, 2008). Reconhece-se o aparecimento de HAMA, como resultado da abordagem imunoterapêutica, que emprega administração de anticorpos monoclonais murino (mAb); curiosamente, também podem ser encontrados no soro de indivíduos não tratados (Johnson *et al.*, 1976). O fator reumatóide é definido como um auto-anticorpo que reage com a região Fc da imunoglobulina G (IgG) de mamíferos e está mais frequentemente associado à artrite reumatóide, também no soro de pacientes com muitas outras doenças inflamatórias e de 3 a 5% em indivíduos saudáveis (Johnson *et al.*, 1976).

De um modo geral, muitos tipos de antígenos podem ser utilizados para produzir IgY antígeno-específica, tais como: proteínas, bactérias, vírus, parasitas, fungos, polipeptídeos, hormônios, toxinas, entre outros (Schade *et al.*, 2005).

1.1.3. Rendimento

Frangas acumulam altos teores de IgY na gema e são consideradas eficientes produtoras de anticorpos (Gottstein *et al.*, 1985) e a quantidade total de IgY na gema do ovo é relativamente constante (0,6% peso/peso) independente da raça da franga, do peso do ovo, da produção do ovo ou período experimental (Li *et al.*, 1998). Resultado similar sobre concentração de IgY durante a imunização de frangas, já havia sido relatado (Shimizu *et al.*, 1988; Sunwoo *et al.* 1996).

Shin *et al.* (2002) estimaram que 1mL de gema de ovo continha 9,4mg de IgY e cada ovo, aproximadamente 10mL de gema. Estimando que uma ave coloque aproximadamente 240 ovos (2.400mL de gema de ovo) por ano, portanto, uma ave imunizada teria um rendimento de aproximadamente 23g de IgY por ano. Akita *et al.* (1992) e Chalghoumi *et al.* (2009b) encontraram dados similares. Também é importante ressaltar que esses resultados são de somente uma ave, uma franga poedeira pode colocar ovos durante dois anos em uma média de vinte ovos por mês (Chalghoumi *et al.*, 2009b).

O rendimento de IgY pode ser comparado a IgG obtida a partir de métodos de imunização convencionais; 200mg de IgG podem ser obtidos mensalmente, enquanto, pelos cálculos demonstrados a IgY rende aproximadamente 2g por mês, ou seja, rendimento dez vezes maior para a IgY (Schade *et al.*, 1994). Svendsen *et al.* (1996) descreveram que a produção de anticorpos em aves, utilizando a gema de

ovo como fonte dos anticorpos, era de cinco a dez vezes maior que a produção em coelho.

1.1.4. Propriedades moleculares da IgY

1.1.4.1. Estrutura

Historicamente, a IgY era chamada de IgG, no entanto, tornou-se claro que esta denominação é inadequada devido a diferenças estruturais entre as duas moléculas. Essas diferenças estruturais da molécula de IgY são refletidas nas diferentes interações moleculares e bioquímicas (Schade *et al.*, 2005). Agora se sabe que esta imunoglobulina é evolutivamente a precursora das imunoglobulinas IgG e IgE de mamíferos (Warr *et al.*, 1995).

A IgY tem peso molecular de aproximadamente 180kDa, ou seja, mais pesado que o peso molecular da IgG de mamíferos (aproximadamente 150 kDa) (Shimizu *et al.*, 1993). A cadeia pesada da IgY é de 70 kDa, enquanto o peso molecular da cadeia pesada da IgG de mamífero é de 50 kDa. Ambos os anticorpos possuem o mesmo peso da cadeia leve: 21 kDa (Hatta *et al.*, 1993). O grande peso molecular da IgY se deve ao número aumentado de domínios constantes e cadeias de carboidratos da cadeia pesada (Warr *et al.*, 1995). Recentemente, também foi sugerido que a molécula de IgY é mais hidrofóbica que a molécula de IgG (Davalos-Pantoja *et al.*, 2000).

A estrutura geral da molécula da IgY consiste de duas cadeias pesadas (H – “heavy”) idênticas e duas cadeias leves (L – “light”) também idênticas, que são ligadas por pontes dissulfeto. A cadeia leve da IgY consiste de um domínio variável (V_L), e um domínio constante (C_L), similar a IgG de mamífero (Figura 1.1). Porém, a ligação dissulfeto intra-cadeia entre o domínio V_L e o domínio C_L da cadeia leve, que estabiliza a estrutura da cadeia leve da IgG de mamífero é ausente na cadeia leve da IgY e, assim as forças intra-moleculares da IgY são mais fracas que da IgG de mamífero (Shimizu *et al.*, 1993).

A cadeia pesada da IgY contém um domínio variável (V_H) e quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}), diferente da IgG de mamífero que tem três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) (Figura 1.1) (Chalghoumi *et al.*, 2009b). Em adição, a molécula de IgY é menos flexível comparada à IgG devido à ausência da região de dobradiça (Warr *et al.*, 1995). Na cadeia pesada da IgG, os domínios C_{H1}

e o C_{H2} são separados pela região de dobradiça, que dá considerável flexibilidade ao fragmento Fab (porção com atividade de ligação ao antígeno). Em contraste, a cadeia pesada da IgY não tem a região de dobradiça, porém possui resíduos de prolina e glicina nas regiões entre dos domínios C_{H1}-C_{H2} e C_{H2}-C_{H3}. Essas regiões têm o potencial de conferir certa flexibilidade na molécula (Chalghoumi *et al.*, 2009b).

Comparações das sequências dos domínios na IgG e na IgY têm mostrado que os domínios C_{H2} e C_{H3} da IgG são equivalentes aos domínios C_{H3} e C_{H4} da IgY, respectivamente. O equivalente do domínio C_{H2} da IgY não existe na cadeia pesada da IgG (Chalghoumi *et al.*, 2009b).

Como na IgG, a porção Fc da IgY é o sitio da maior parte das funções biológicas efetoras. Esta contém dois carboidratos lateralmente às cadeias, em contraste da IgG que possui somente um carboidrato (Figura 1.1) (Schade *et al.*, 2005; Chalghoumi *et al.*, 2009b).

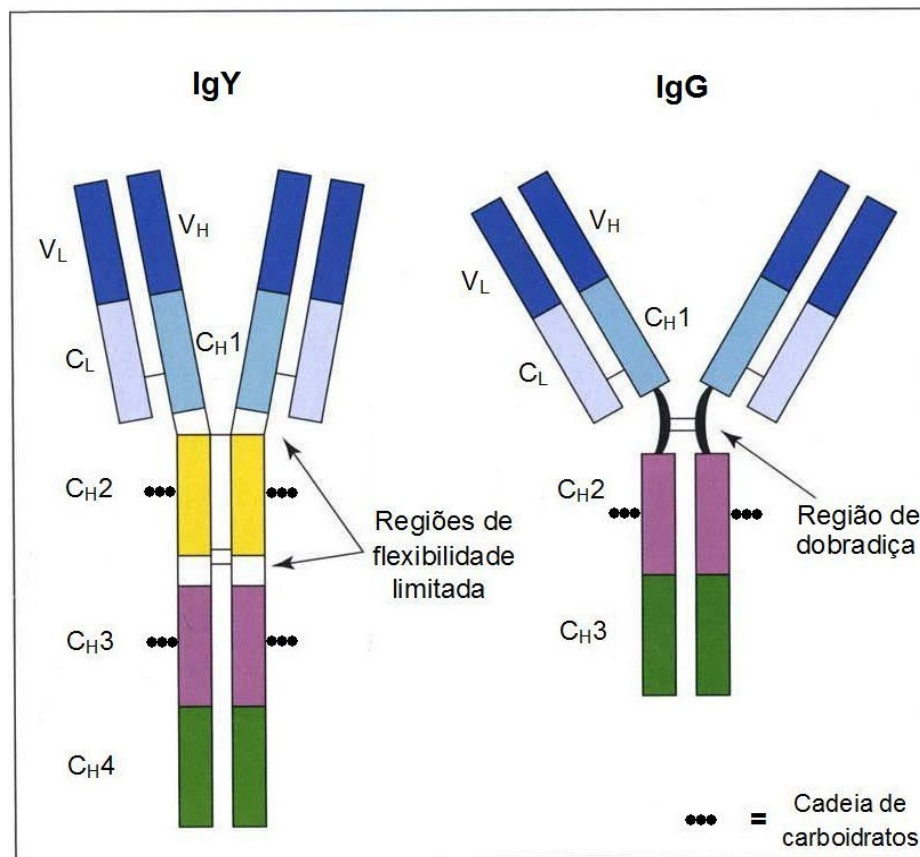


Figura 1.1 – Representação esquemática da IgY de aves e da IgG de mamíferos. (Modificado de Warr *et al.*, 1995)

1.1.4.2. Estabilidade

A estabilidade da IgY frente à variação de pH tem sido estudada em várias condições. Verificou-se que a atividade da IgY diminuiu em pH 3,5 ou menor e foi quase completamente perdida em pH 3 (Shimizu *et al.*, 1988, 1992, 1993). A rápida diminuição da atividade da IgY em pH baixo indica mudança conformacional e dano na porção Fab, incluindo o local de ligação ao antígeno. Sob condições alcalinas, a atividade da IgY não se alterou até atingir pH 11, reduzindo significativamente em pH 12 ou superior (Shimizu *et al.*, 1988, 1992, 1993). Resultados similares foram reportados por Löscher *et al.* (1986), Hatta *et al.* (1993), Lee *et al.* (2002) e Shin *et al.* (2002), tanto nas condições ácidas como alcalinas.

A IgY é relativamente resistente à tripsina ou à quimiotripsina, mas é bastante sensível à pepsina. Hatta *et al.* (1993) demonstraram que quase toda atividade da IgY é perdida após incubação com pepsina e que 61% da atividade é perdida depois de oito horas de incubação com tripsina. A estabilidade da IgY contra a pepsina aparenta ser altamente dependente do pH e da razão enzima/substrato. Em pH 5 ou maior, IgY foi bastante resistente à pepsina e manteve sua ligação ao antígeno e atividade de aglutinação de células, apesar de, em pH 4,5 ou abaixo, ambas as atividades foram perdidas (Shimizu *et al.*, 1988). Os resultados de Hatta *et al.* (1993), que também observaram o comportamento da IgY com pepsina sob diferentes tempos de incubação e pH, confirmaram a susceptibilidade da IgY a esta enzima em baixos valores de pH. A incubação de IgY com pepsina a pH 2 resultou em hidrólise completa da molécula do anticorpo, deixando somente pequenos peptídeos. Entretanto, incubação com pepsina a pH 4 manteve 91% e 63% da atividade após incubações de uma e quatro horas, respectivamente.

Sobre a estabilidade da IgY sob diferentes condições térmicas, Shin *et al.*, (2002) encontraram que a IgY foi estável a 40°C, porém perdeu aproximadamente 20% da sua atividade a 60°C por 10 minutos. Shimizu *et al.* (1988, 1992) e Hatta *et al.* (1993) encontraram resultados parecidos e demonstraram também que acima de 70°C a IgY perdeu grande parte de sua atividade. O anticorpo perdeu mais de 90% de sua atividade quando aquecido a 80°C (Chang *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2002). Pelo fato da IgY ser estável a 60°C, esta tolera o processo de esterilização pelo método da pausterização (Shin *et al.*, 2002).

Congelamento ou liofilização da IgY não afetam sua atividade, a menos que esses processos sejam repetidos várias vezes (Shimizu *et al.*, 1988). Fu *et al.* (2006)

também demonstraram que a IgY pode ser liofilizada e as propriedades físicas, biológicas e de neutralização se mantêm. A atividade de ligação da imunoglobulina se manteve inalterada no teste imunoenzimático (ELISA), e testes de estabilidade demonstraram que a atividade de ligação não diminuiu significativamente, mesmo quando a IgY liofilizada era submetida a 90°C durante quinze minutos, ilustrando a estabilidade térmica da liofilização. A atividade também permaneceu inalterada sob condições ácidas de pH 2 a 7 após tratamento a 37°C por duas horas. Ademais, a atividade também se manteve durante mais de cinco meses de armazenamento a -20°C, 4°C ou temperatura ambiente (Fu *et al.*, 2006).

A região Fc é a parte mais hidrofóbica na molécula de anticorpo e como esta região é maior na IgY que na IgG, a molécula de IgY é mais hidrofóbica que a molécula de IgG (Davalos-Pantoja *et al.*, 2000). A IgY também é relativamente estável a pressão, não havendo inativação até 4.000kg/cm² (Shimizu *et al.*, 1994).

1.1.5. Conteúdo da gema

Água, lipídios e proteínas são os principais constituintes da gema do ovo, onde a água representa aproximadamente 50% do total. A parte lipídica é aproximadamente um terço da gema e contém triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol. As proteínas compõem de 15 a 17% da gema, e podem ser separadas em duas frações principais através da centrifugação; a granular (fluido precipitado) e o plasma (fluido sobrenadante claro) (Li *et al.*, 1998; Kovacs-Nolan *et al.*, 2005b).

A fração granular possui 22% das proteínas totais da gema, sendo composta por 70% de lipoproteínas de alta-densidade (HDL: α - e β -lipovitelinas), 16% de fosvitina (glicofosfoproteína) e 12% de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL) (Burley *et al.*, 1961). A fração de plasma possui 78% das proteínas totais da gema, sendo composta por 86% de LDL e 14% de livetinas (McCully *et al.*, 1962). As livetinas são glicoproteínas globulares livres de lipídios, solúveis em água, e que são divididas em três classes: α -, β - e γ -livetinas (Bernardi *et al.*, 1960). A IgY é a proteína predominante da γ -livetinas (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005a; Nilsson *et al.*, 2008a).

Mann *et al.* (2008) afirmam que foram os primeiros a identificar algumas proteínas plasmáticas na gema do ovo. Nilsson *et al.* (2008a) também encontraram algumas proteínas plasmáticas, tais como: fibrinogênio, hemopexina e o fator de coagulação IX. Alguns autores encontraram proteínas na gema do ovo que são

conhecidamente pertencentes à clara (Nilsson *et al.*, 2006, 2007; Mann *et al.*, 2008). Exemplos dessas proteínas encontradas tanto na clara como na gema são: ovoalbumina, ovomucóide, ovotransferrina, cistatina e ovoinibidores. Interessantemente, a ovotransferrina e a cistatina apresentam atividade antibacteriana, enquanto a ovomucóide e a ovoinibidor têm atividade antiviral, sendo que algumas destas proteínas mencionadas também são imunoestimulatórias (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005b). As lipoproteínas (LDL e HDL) também foram sugeridas por terem efeito antibacteriano (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005b). Um número de apolipoproteínas foi detectado no purificado de IgY: apolipoproteína A1, apolipoproteína B, vitelogeninas 1 e 2, e apovitelinina 1 (Nilsson *et al.*, 2008a). Este dado demonstra que outras proteínas presentes no purificado de IgY podem gerar efeitos positivos adicionais no tratamento com IgY além do efeito primário dos anticorpos (Nilsson *et al.*, 2008a).

Determinar a concentração de colesterol no preparado de IgY para o fim da administração oral é interessante, uma vez que a alta concentração deste pode contribuir para elevação do colesterol plasmático após consumir o produto contendo IgY. A quantidade de colesterol e triglicerídeos é baixa, onde a concentração de colesterol é aproximadamente dez vezes menor que o nível normal no soro humano, portanto, a ingestão diária de IgY não deve afetar os níveis de colesterol e triglicerídeos (Nilsson *et al.*, 2008a). Além disso, alguns autores demonstraram que o consumo de ovo não necessariamente afeta os níveis de colesterol sérico (Dawber *et al.*, 1982; Qureshi *et al.*, 2007), inclusive gera o efeito contrário, comer ovo pode até diminuir os níveis de colesterol sérico (Song *et al.*, 2000).

1.1.6. Transferência da IgY para gema do ovo

Três classes de imunoglobulinas, que são distinguidas em concentração, estrutura e funções imunoquímicas, são encontradas nas aves: IgA, IgM e IgY. A IgA e IgM são similares às IgA e IgM de mamíferos no peso molecular, estrutura e mobilidade eletroforética. A IgY representa cerca de 75% do total de imunoglobulinas nas aves e as concentrações séricas de IgY, IgA e IgM são de 5.0, 1.25 e 0.61mg/mL, respectivamente (Leslie *et al.*, 1973).

Os anticorpos são transferidos da ave para a progênie no estágio de formação do ovo, e desempenham um importante papel protetor para o embrião em

desenvolvimento. A IgY é continuamente secretada durante a embriogênese, fornecendo evidências de imunização passiva proveniente da ave (Li *et al.*, 1998).

Nas aves, somente o ovário e o oviduto esquerdo se desenvolvem. O ovário possui cinco ou seis folículos ovarianos em estágios de maturação, de F1 a F6, onde o estágio F6 é a fase inicial de maturação do folículo e o F1 é o folículo mais maduro e o próximo folículo a ovular, na iminência de ser expelido durante a postura (Figura 1.2). Logo que o F1 é ovulado, o folículo F2 passa a ser F1, o mesmo ocorre com todos na cadeia hierárquica, e um novo folículo é selecionado a ser o F6, proveniente do estroma com folículos pequenos (Conn, 2008).

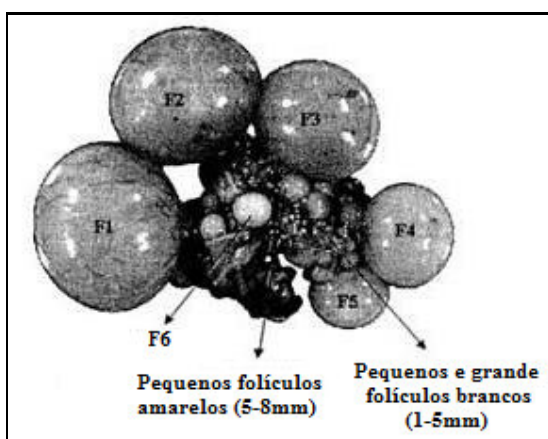


Figura 1.2 – Ovário de franga. Os folículos em estágio de pré-ovulação estão identificados de acordo com o tamanho, onde F1 é o maior folículo e o próximo a ser ovulado, seguido pelo folículo F2, o segundo maior, e assim por diante. Pequenos folículos são classificados de acordo com o tamanho e a cor da gema. (Adaptado de Conn, 2008)

Patterson *et al.* (1962a) e Rose *et al.* (1981) demonstraram que a IgY proveniente do sangue da galinha é secretada seletivamente por transporte ativo, através da membrana folicular (oolema) do ovário para a gema (oócito) dos folículos ovarianos em maturação. A transferência da IgY para os folículos ocorre via um receptor específico na superfície da membrana do saco vitelínico, que permite o transporte seletivo de todas as sub-populações de IgY apresentadas no sangue da ave (Tressler *et al.*, 1987; Mohammed *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 2001). O receptor de membrana específico presente no saco vitelínico é o receptor Fc da gema do ovo (FcRY), homólogo a um receptor (PLA₂R) pertencente da família de receptores de manose de mamíferos (West *et al.*, 2004). O FcRY apresenta característica pH ácido-dependente, necessitando de condição ácida para se ligar à IgY (West *et al.*,

2004). Morrison *et al.* (2001) e West *et al.* (2004) identificaram várias regiões na molécula do anticorpo que são importantes para sua ligação aos receptores. Seus dados demonstraram que a região Fc (região constante da molécula do anticorpo), e a região da dobradiça, exceto os carboidratos associados à região Fc (Figura 1.1) são requeridos para esse transporte. A região Fab também não tem participação. O receptor FcRY se liga especificamente ao domínio C_H3-C_H4 (Figura 1.1) da região Fc da IgY para realizar o transporte do anticorpo (Morrison *et al.*, 2001; West *et al.*, 2004; Kitaguchi *et al.*, 2008). A razão de proporção entre receptores e moléculas de IgY é de 2 para 1, respectivamente, ou seja, cada IgY se liga a dois receptores FcRY, onde cada receptor interage com uma das cadeias do dímero da molécula do anticorpo (West *et al.*, 2004). A passagem transovariana da IgY demora aproximadamente de 3 a 6 dias (Patterson *et al.*, 1962b; Woolley *et al.*, 1995). A quantidade de IgY transferida para a gema do ovo tem sido relatada como proporcional à concentração de IgY no soro materno (Loeken *et al.*, 1983; Al-Natour *et al.*, 2004; Hamal *et al.*, 2006). Tesar *et al.* (2008) sugeriram a possibilidade da homeostase da IgY no soro das aves ser regulada pelo receptor FcRY.

Kitaguchi *et al.* (2008) demonstraram que as imunoglobulinas monoméricas (IgY) são muito mais eficientemente incorporadas no folículo ovariano que as imunoglobulinas poliméricas, como a IgA, que forma complexos de dímeros e a IgM, que forma pentâmeros (Janeway *et al.*, 2002). A IgY é incorporada na gema aproximadamente oito vezes mais que as outras imunoglobulinas (Kitaguchi *et al.*, 2008). A possível explicação para a menor absorção de imunoglobulinas poliméricas é o tamanho causado pela polimerização, resultando em baixa infiltração através da membrana folicular (Kitaguchi *et al.*, 2008). Estes autores propuseram um sistema de facilitação do transporte da IgY na membrana folicular, onde há um portão que bloqueia a passagem das imunoglobulinas poliméricas (Figura 1.3). Este portão está localizado na membrana folicular do ovário, mas o local preciso ainda é desconhecido. Entre as imunoglobulinas monoméricas que passam através do portão, a IgY liga-se preferencialmente ao receptor ou a proteína carreadora que reconhece a região Fc, enquanto as outras imunoglobulinas monoméricas ligam-se com menos eficiência, pois o receptor presente na membrana é o FcRY (West *et al.*, 2004; Kitaguchi *et al.*, 2008).

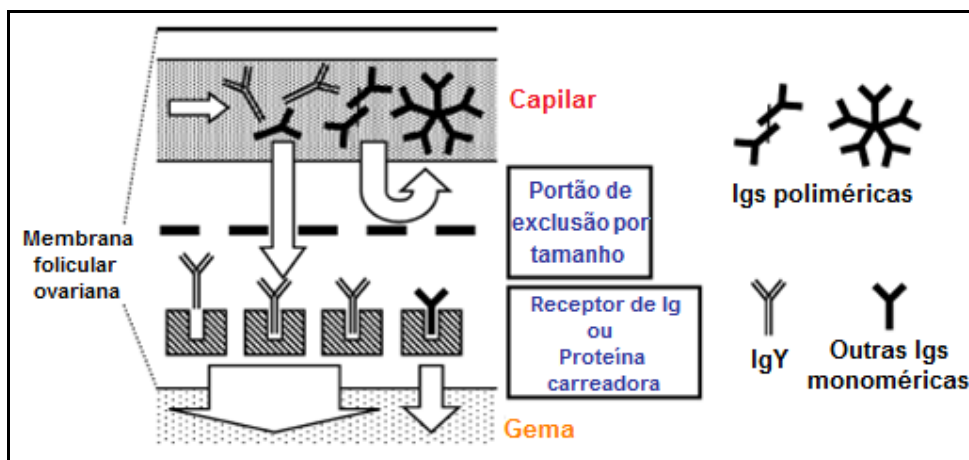


Figura 1.3 – Ilustração esquemática do transporte seletivo no folículo ovariano aviado. Imunoglobulinas presentes no capilar sanguíneo passam através da membrana folicular. A linha pontilhada representa o portão de exclusão por tamanho, onde imunoglobulinas poliméricas são bloqueadas e imunoglobulinas monoméricas têm passagem. Entre as imunoglobulinas monoméricas que passaram através do portão, a IgY liga-se preferencialmente ao receptor ou a proteína carreadora que reconhece a região Fc, enquanto as outras imunoglobulinas monoméricas ligam-se com menos eficiência. (Adaptado de Kitaguchi *et al.*, 2008)

IgA e IgM estão presentes na clara do ovo como resultado de secreção mucosa destes por células do oviduto (Rose *et al.*, 1974). Nesta, as concentrações de IgA (~0.7mg/mL) e IgM (~0.15mg/mL) são relativamente pequenas enquanto a de IgY (8-25mg/mL) na gema do ovo é considerada alta (Rose *et al.*, 1974; Hamal *et al.*, 2006). Apesar da IgA e da IgM serem predominantemente imunoglobulinas da clara, Yamamoto *et al.* (1975) relataram que há a transferência de pequenas quantidades de ambas as imunoglobulinas da clara para gema em ovos que não foram fecundados.

1.1.7. 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 pode não ser muito previsível. Dois fatores muito importantes influenciam esta resposta: tipo de adjuvante usado e a via de administração do antígeno (Schade *et al.*, 1996).

1.1.7.1. Adjuvante

Para a indução de altos e sustentáveis títulos de anticorpo utiliza-se adjuvante, apesar da imunização das aves sem o uso de qualquer adjuvante também resultar em títulos aceitáveis de anticorpo (Calzado *et al.*, 2001). Existe mais de cem adjuvantes, que diferem em suas características químicas, sua eficácia na estimulação do sistema imune e seus efeitos colaterais (Chalghoumi *et al.*, 2009b). 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 e ressecamento (Lévesque *et al.*, 2007). Porém, recentemente, o CFA está sendo usado com menos frequência, pois tem sido associado à inflamação severa e necrose tecidual no local da inoculação em mamíferos (Wanke *et al.*, 1996). Em aves, o uso do CFA não parece ocasionar lesões severas como nos mamíferos. Os resultados de Gassmann *et al.* (1990) e Svendsen *et al.* (1996) sugerem que as galinhas apresentam maior resistência ao dano tecidual pelo CFA que coelhos, apesar de os resultados de Wanke *et al.*, (1996) e Olbrich *et al.* (2002) contradizerem esses dados. O substituto mais efetivo encontrado foi o adjuvante incompleto de Freund (IFA), que atualmente é o mais usado para produção de imunoglobulinas específicas (Lévesque *et al.*, 2007; Chalghoumi *et al.*, 2009b).

Ambos IFA e CFA são adjuvantes lipofílicos, que armazenados no local da administração, liberam o antígeno lentamente permitindo a estimulação duradoura do sistema imune. No IFA, alguns componentes da micobactéria são removidos para eliminar a necrose tecidual, tendo como consequência uma menor imunoestimulação (Lévesque *et al.*, 2007). Muitos estudos utilizaram os dois adjuvantes: o CFA na primeira imunização e o IFA na segunda imunização (Kapoor *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Chalghoumi *et al.*, 2008). Nesses estudos, os resultados foram alcançados e não houve efeito adverso. A alternativa é a suplementação do IFA para potencializar a estimulação do sistema imune. Outro adjuvante promissor é o uso de Oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfato-guanosina (CpG-ODN) (Klinman *et al.*, 1999; Hemmi *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2004; Hemmi *et al.*, 2005). Lévesque *et al.* (2007), concluíram que o uso de CpG-ODN na imunização das frangas resultou em um aumento de até 480% da concentração de anticorpos específicos presentes na gema, embora ocorresse um pequeno aumento nos custos do procedimento. A CpG-ODN é reconhecida pelas células do sistema imune

através dos receptores “Toll-like” (TLR) 9. As TLRs são receptores reconhecedores de padrões (PRR) que se ligam a certos padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) (Medzhitov *et al.*, 1997), e estão amplamente distribuídas nas células do sistema imune tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células B, bem como células epiteliais das mucosas e células endoteliais (Cario *et al.*, 2000; Faure *et al.*, 2001; Visintin *et al.*, 2001). A TLR 9 é expressa no compartimento endossomal das células citadas e reconhece sequências CG incluídas em certas sequências conservadas, tornando o CpG-ODN um promissor candidato a adjuvante (Dalpke *et al.*, 2002).

1.1.7.2. Via de inoculação

A rota mais comum para injeção do antígeno em aves é a via intramuscular. A injeção é habitualmente aplicada no músculo peitoral (Schade *et al.*, 2005). As galinhas podem também ser injetadas subcutaneamente na região cervical. Entretanto, em animais muito jovens, é preferível que a injeção seja administrada via intramuscular no músculo peitoral, pois a injeção subcutânea é mais difícil de ser aplicada e pode causar sofrimento (Schade *et al.*, 1996). Chang *et al.* (1999) encontraram que a imunização pela via intramuscular resultou no aumento da quantidade de anticorpos específicos quando comparada com a imunização subcutânea.

1.1.7.3. Purificação

A gema do ovo contém altas concentrações de anticorpos, mas a alta concentração de lipídios na gema é a maior limitação para o processo de purificação dos anticorpos. Existem várias formas de purificar a IgY da gema do ovo, como por exemplo, por sal, sulfato de dextrano, diluição xantana, goma, etanol, precipitação por polietileno glicol (PEG), cromatografia tiofílica, diluição em água, entre outros (Akita *et al.*, 1992, 1993; Hansen *et al.*, 1998). O método de diluição em água produz preparado contendo lipídios e proteínas solúveis em água (Akita *et al.*, 1992). Este método é simples, rápido, adequado para produção em larga escala e eficiente para a obtenção de IgY, que é importante para uso medicinal que necessita de grandes quantidades (Akita *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 2008a). O método de diluição em água não possui qualquer componente tóxico ou qualquer outro aditivo, somente água com baixos níveis de colesterol e triglicerídeos (Nilsson *et al.*, 2008a). Portanto, o

tratamento com administração oral da IgY é comparado a comer ovos, e como tal não é tóxico, a única precaução que deve ser levada em consideração na terapia oral é com indivíduos alérgicos a constituintes do ovo (Nilsson *et al.*, 2008a).

A precipitação da gema do ovo por polietileno glicol, acidificação e o método de diluição por água são os mais comuns (Akita *et al.*, 1993; Davalos-Pantoja *et al.*, 2000; Larsson *et al.*, 1990; Svendsen *et al.*, 1995). O congelamento e descongelamento da gema e a precipitação com gomas ou solventes orgânicos também têm sido muito relatados (Verdoliva *et al.*, 2000; Bade *et al.*, 1984; Hatta *et al.*, 1990). A primeira etapa na purificação da IgY envolve a extração dos lipídios e lipoproteínas. Uma vez que os lipídios são retirados da amostra, a IgY é geralmente purificada por precipitação sendo os mais usados polietileno glicol e sulfato de amônio (Akita *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1998; Polson, 1990). A pureza e o rendimento variam muito de método para método (Gee *et al.*, 2003). Fu *et al.* (2006) obtiveram pureza da IgY de 92% após purificação através do método de diluição por água (Akita *et al.*, 1993) e cromatografia. A IgY isolada tinha elevado grau de pureza confirmado pelo SDS-PAGE e apresentou boa atividade biológica como confirmado pelo “Western Blotting” (Fu *et al.*, 2006).

Apesar das claras vantagens da utilização de IgY na pesquisa e diagnóstico, o uso de rotina é muitas vezes considerado impraticável devido a limitações existentes nos protocolos de purificação da IgY (Akerstrom *et al.*, 1985; Camenisch *et al.*, 1999). As proteínas A e G são comumente empregadas para a purificação de anticorpos policlonais, mas são incapazes de ligarem-se a IgY devido uma diferença na região Fc deste anticorpo (Akerstrom *et al.*, 1985; Camenisch *et al.*, 1999). A alta concentração de lipídio na gema do ovo também interfere nas purificações que utilizam como método a afinidade, porém, tem sido feito muitos esforços para sintetizar ligantes de IgY para permitir a purificação por afinidade (Hansen *et al.*, 1998; Verdoliva *et al.*, 2000).

1.1.8. Aplicação

Tem crescido o interesse no uso da imunoglobulina Y de gema de galinhas para imunoterapia, imunodiagnóstico e em casos de inibição da rejeição em xenotransplante (Fryer *et al.*, 1999; Erhard *et al.* 2000; Tini *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2008a). A administração oral de IgY purificada pode ser usada em imunoterapia passiva contra infecções no trato gastrointestinal por bactérias e vírus. Deste modo,

a IgY é uma alternativa a antibióticos para tratamento de patógenos entéricos antibiótico-resistentes em humanos e animais (Carlander *et al.*, 2000). Muitos estudos em animais e humanos com IgY contra diferentes patógenos têm provado que esta imunoglobulina tem sido eficiente na prevenção e tratamento de infecções. Por exemplo, Di Lonardo *et al.* (2001) sugeriram que a tecnologia da IgY possa ser utilizada futuramente como uma ferramenta de diagnóstico para o HPV 16 em amostras clínicas. Rollier *et al.* (2000) obtiveram sucesso na produção de IgY contra o vírus da hepatite B de patos (DHBV), muito similar ao vírus da hepatite B (HBV) de humanos. Mine *et al.* (2002) relataram produção de IgY contra rotavíruses de bovino e humano, enquanto Carlander *et al.* (2000) relataram que a IgY contra *Escherichia coli* reduziu mortalidade em leitões recém nascidos. A salmonelose pôde ser prevenida tanto em bezerros como em ratos neonatos (Yokoyama *et al.*, 1998a, 1998b; Mine *et al.*, 2002). O uso da IgY em humanos contra *Streptococcus mutans* diminuiu cáries quando rinsado na boca (Hatta *et al.*, 1997) e IgY anti-*Helicobacter pylori* diminuiu infecções gástricas por *Helicobacter* (Shin *et al.*, 2002, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Horie *et al.*, 2004). A IgY anti-*H. pylori* tem sido testada como suplemento em iogurte (Horie *et al.*, 2004), o que demonstra a possibilidade de utilização da IgY em alimentos funcionais. Apesar de o mecanismo que previne a colonização não ter sido elucidado, é sugerido que a IgY anti-*H. pylori* iniba a aderência do *H. pylori* no epitélio estomacal (Shin *et al.*, 2002). Nilsson *et al.* (2008b) trataram pacientes de fibrose cística com doses orais de IgY anti-*Pseudomonas* e este tratamento preveniu infecções por *Pseudomonas aeruginosa* e retardou a progressão para infecção crônica (Kollberg *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2008b). Mine *et al.*, 2002 comprovaram que a IgY foi eficiente para os seguintes agentes: coronavírus bovino, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus spp.* e *P. aeruginosa*.

O principal modo de ação é a ligação dos anticorpos a certos componentes da superfície bacteriana como proteínas de membrana, lipopolissacarídeos (LPS), flagelo e fímbria (ou pili). A hipótese é que esses componentes de superfície de células podem ser facilmente reconhecidos pelos anticorpos e essa ligação pode levar a insuficiência das funções biológicas desses componentes, os quais desempenham papel importante no crescimento bacteriano (Sim *et al.*, 2000) e na ligação com as células intestinais (Yokoyama *et al.*, 1998b). Desta forma, os anticorpos protegem contra adesão da bactéria às células do intestino (Sugita-

Konishi *et al.*, 2000; Girard *et al.*, 2006; Chalghoumi *et al.*, 2009a) e previnem a invasão das células epiteliais (Sugita-Konishi *et al.*, 2000).

A IgY é resistente à barreira gástrica (Lee *et al.*, 2002), porém, Chang *et al.* (2002); Cho *et al.* (2005) e Kovacs-Nolan *et al.* (2005a) demonstraram que o uso de micro-cápsulas pode ser um método útil e efetivo para proteger a IgY da inativação gastrointestinal na utilização da terapia oral por IgY, além da proteína ovomucóide, presente na gema do ovo purificada, que protege até certo ponto contra a degradação proteolítica pelas enzimas digestivas (Shah *et al.*, 2004; Kovacs-Nolan *et al.*, 2005b).

1.2. Vírus da hepatite A

1.2.1. Histórico

A doença descrita como “icterícia” na literatura das antigas civilizações grega, romana e chinesa, provavelmente era uma hepatite viral. A etiologia viral foi postulada como causa de certas formas de icterícia logo em 1912 e o termo “hepatite infecciosa” foi usado porque a doença muitas vezes ocorria em epidemias, como a ocorrida na ilha de Minorca, Espanha, durante o século XVIII (Cockayne, 1912).

Em 1931, Findlay *et al.* publicaram um artigo em que se revisava a história das epidemias de icterícia e surtos da época em Surrey, Inglaterra, e concluíram que estes eram causados provavelmente por um “vírus ultramicroscópio que é patogênico somente no homem”, semelhante à varicela-zoster, rubéola e dengue. A transmissão da doença de homem para homem foi primeiramente relatada experimentalmente em voluntários na Alemanha em 1942 (Voegt, 1942), e no Oriente Médio em 1943 (Cameron, 1943), mais de 25 anos antes de uma bem sucedida transmissão em modelo animal (Holmes *et al.*, 1969).

Hepatite A, um termo introduzido pela primeira vez por Krugman *et al.* em 1967, agora é conhecida por ser causada pela infecção com o vírus da hepatite A (HAV), um de cinco vírus que podem causar hepatite viral, cada um pertencente a uma família diferente, cujo principal local de replicação é o fígado. Estudos epidemiológicos e de transmissão com humanos demonstraram que a hepatite infecciosa, ou hepatite A, era transmitida principalmente pela via fecal-oral (Krugman

et al., 1959, 1962, 1967). Em 1973, o HAV foi identificado nas fezes de pessoas infectadas (Feinstone *et al.*, 1973), que desencadeou o desenvolvimento de testes diagnósticos, a propagação em cultura de células, caracterização molecular e desenvolvimento de uma vacina (Feinstone *et al.*, 1973; Provost *et al.*, 1979).

1.2.2. O vírus

O vírus da hepatite A é um vírus de RNA, não envelopado, de simetria icosaédrica, com 27 a 32 nm de diâmetro (Feinstone *et al.*, 1973) e que pertence ao gênero *Hepatitisvirus* da família *Picornaviridae*. Ao contrário de outros membros da família, o HAV requer um longo período de adaptação para crescer em cultura de células, replica lentamente e raramente produz efeito citopático (Lemon *et al.*, 1992). O HAV é estável no ambiente por pelo menos um mês (McCaustland *et al.*, 1982) e é mais resistente ao calor e inativação pelo cloro do que o poliovírus. A inativação do HAV em alimentos requer o aquecimento a 85°C por um minuto e a desinfecção de superfícies requer um minuto de contato com uma diluição de 1:100 de hipoclorito de sódio, enquanto o poliovírus é inativado a 72°C por 15 segundos e pelo tratamento de hipoclorito de sódio com diluição de 1:125 por 30 segundos (Weber *et al.*, 1999; Margolis, 2000; Strazynski *et al.*, 2002).

1.2.3. Organização genômica

A organização genômica do HAV é semelhante a de outros picornavírus (Hollinger, 1996). O RNA é de fita simples com polaridade positiva e genoma de 7,5kb de comprimento (Najarian *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1987a, 1987b; Hollinger, 1996). O genoma é composto de três regiões: uma região não-codificante 5' (NCR) de 734 a 740 nucleotídeos, que possui uma proteína viral (proteína do vírion ligada ao genoma - VPg) covalentemente ligada a essa região (Weitz *et al.*, 1986); uma região codificante com somente uma área aberta de leitura (ORF) com três regiões distintas (P1, P2 e P3) que codifica uma poliproteína de 2.225 a 2.227 aminoácidos (6.675 a 6.681 nucleotídeos); e uma região não-codificante 3' de 40 a 80 nucleotídeos, que possui cauda poli-A (Baroudy *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1987b; Hollinger, 1996) (Figura 1.4). A poliproteína após ser traduzida sofre clivagem mediada por uma protease viral (3Cpro) (Schultheiss *et al.*, 1994), que resulta na produção de quatro proteínas do capsídeo e várias proteínas não-estruturais (Figura 1.4).

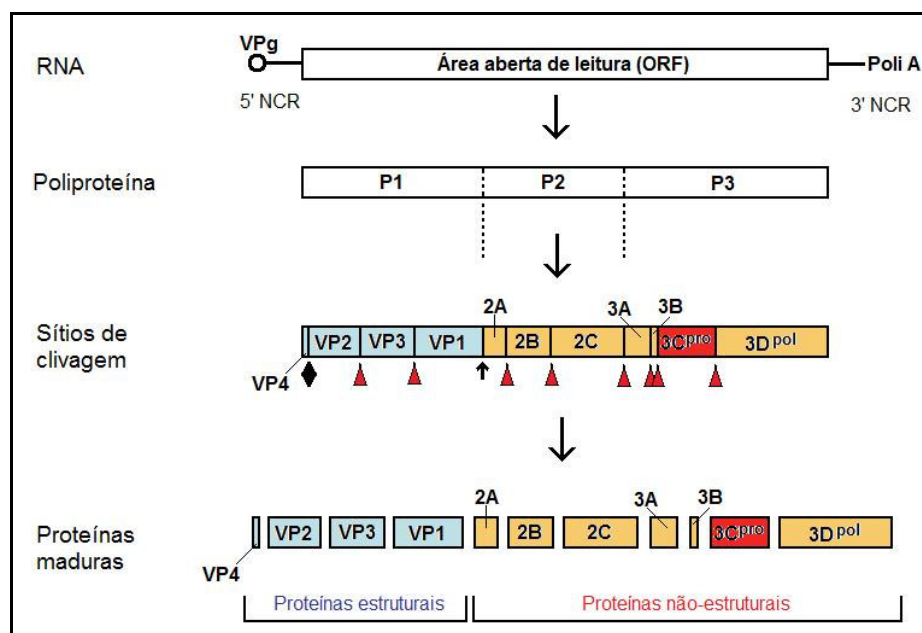


Figura 1.4 – Organização do genoma do HAV (isolado viral tipo selvagem HM175), processamento da poliproteína, proteínas estruturais e não-estruturais maduras. O RNA genômico (fita positiva) contém somente uma área aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína, processada por proteases virais, 3Cpro (retângulo vermelho, cliva nos sítios identificados com triângulo vermelho), uma protease celular ainda não identificada (seta curta) e uma atividade proteolítica desconhecida (losango preto). (Modificado de Totsuka *et al.*, 1999 e Martin *et al.*, 2006)

1.2.4. Proteínas

A região P1 codifica as três principais proteínas do capsídeo viral que são VP1, VP2 e VP3 (Gauss-Muller *et al.*, 1986). Uma quarta proteína viral (VP4), que é essencial para formação viral (Probst *et al.*, 1999), não é detectada nas partículas virais maduras (Totsuka *et al.*, 1999). Durante a replicação as proteínas do capsídeo são clivadas da poliproteína precursora pela protease viral 3Cpro (Schultheiss *et al.*, 1994), que é codificada pela região P3. Entretanto, ainda não foi elucidado como ocorre a clivagem de VP2/VP4. Os locais de clivagem são demonstrados na figura 1.4 (triângulos vermelhos). A conformação nativa das proteínas do capsídeo VP1 e VP3 forma um único epítipo dominante na superfície viral, que provoca resposta de anticorpos neutralizantes. As funções das proteínas não-estruturais codificadas pelas regiões P2 e P3 são na síntese do RNA e na formação do vírion. A proteína VPg também é codificada pela região P3, sendo covalentemente ligada à terminação genômica 5' e está envolvida na iniciação da síntese do RNA viral (Weitz *et al.*, 1986) (Figura 1.4).

1.2.5. Diversidade genética do HAV

O vírus da hepatite A apresenta um alto grau de conservação antigênica (aminoácido) e genética (nucleotídeo) ao longo do genoma (Cohen *et al.*, 1987a, 1987b; Robertson *et al.*, 1992). No entanto, existe bastante diversidade genética para definir diversos genótipos e subgenótipos de HAV (Robertson *et al.*, 1992).

Quando a variação da sequência dentro da junção VP1/P2A é usada para definir genótipos e subgenótipos, os genótipos têm mais de 15% de variação nucleotídica entre isolados e subgenótipos têm de 7 a 7,5% de variação nucleotídica (Robertson *et al.*, 1992). Sete genótipos já foram identificados; quatro genótipos (I, II, III e VII) são de origem humana e três (IV, V e VI) são de origem suína. Os genótipos II e VII foram inicialmente definidos com base em um único isolado para cada um (Robertson *et al.*, 1992; Ching *et al.*, 2002). No entanto, outros autores reclassificaram o genótipo VII como um subgenótipo do genótipo II (Costa-Mattioli *et al.*, 2002b; Lu *et al.*, 2004). Os genótipos I e III são os mais prevalentes genótipos isolados de humanos (Nainan *et al.*, 2006).

1.2.6. Sorotipo e antigenicidade

Apesar da heterogeneidade genética do vírus, apenas um único sorotipo de HAV existe. Os indivíduos infectados pelo HAV em uma parte do mundo estão protegidos contra uma reinfecção pelo HAV de outras partes do mundo. Preparados de imunoglobulinas contendo anti-HAV, independente da sua origem geográfica, oferecem proteção contra a doença. Além disso, vacinas preparadas de isolados do vírus originados da Austrália ou Costa Rica protegem de infecções em todo o mundo (Innis *et al.*, 1994; Nalin *et al.*, 1993).

A estrutura antigênica do vírus é relativamente simples, com um número restrito de epítomos que combinados formam apenas um único sítio antigênico dominante que interage com os anticorpos neutralizantes do vírus. Esses epítomos são conformacionais e formados por aminoácidos localizados em mais de uma proteína do capsídeo (Ping *et al.*, 1988, 1992; Nainan *et al.*, 1992; Stapleton *et al.*, 1987). Wang *et al.* (1996) observaram que anticorpos obtidos da fase convalescente de pacientes com hepatite A foram mais reativos principalmente à VP1 e com menor reatividade aos VP0 (combinação de VP2 e VP4) e VP3.

Partículas vazias parecem ser antigenicamente indistinguíveis de partículas infecciosas (vírus contendo o RNA) sugerindo que a antigenicidade pode depender das principais proteínas de montagem do capsídeo ou pequenos precursores do capsídeo. A produção da poliproteína recombinante do HAV foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes para o HAV (LaBrecque *et al.*, 1998).

Variantes antigênicas do HAV que ocorrem naturalmente foram observadas somente em vírus isolados de macacos do “Velho Mundo” (Nainan *et al.*, 1991; Tsarev *et al.*, 1991). Esses vírus são geneticamente distintos dos isolados de HAV humanos e não são reconhecidos por certos anticorpos monoclonais produzidos contra HAV de humanos (Karetnyi *et al.*, 1989; Nainan *et al.*, 1991). Entretanto, o HAV de símios liga-se a anticorpos policlonais anti-HAV de humanos (Emerson *et al.*, 1996). Recentemente, foram relatados isolados de HAV de humanos com substituição de aminoácidos do capsídeo e deleção de sítios antigênicos imunodominantes (Costa-Mattioli *et al.*, 2002b; Sánchez *et al.*, 2002), no entanto, ainda não está claro se a neutralização do vírus por anticorpos foi afetada com essas mudanças (Nainan *et al.*, 2006).

1.2.7. Características Clínicas

A infecção pelo HAV é geralmente auto-limitada e pode causar efeitos que vão desde a ausência de sintomas até óbito por hepatite fulminante (Nainan *et al.*, 2006). A probabilidade da doença clinicamente aparente associada à infecção pelo HAV aumenta com a idade. Em crianças de seis anos de idade, a maioria das infecções (70%) é assintomática (Hadler *et al.*, 1980) e, se a doença acontecer, geralmente não há icterícia. Entre os adolescentes e adultos, as infecções são geralmente sintomáticas, com icterícia ocorrendo em 70% dos pacientes (Lednar *et al.*, 1985). Após um período médio de incubação de 28 dias (intervalo de 15 a 50 dias), a maioria das pessoas infectadas pelo HAV desenvolve sinais e sintomas constitucionais inespecíficos seguidos por sintomas gastrointestinais. Normalmente, incluem febre, mal-estar, anorexia, náusea, desconforto abdominal, acolia fecal, bilirrubinúria e icterícia, que geralmente duram dois meses. No entanto, 15 a 20% dos pacientes podem ter recidiva da doença ou doença prolongada com duração de seis meses (Glikson *et al.*, 1992; Sjogren *et al.*, 1987), onde vírus têm sido detectados no soro por até seis a doze meses após a infecção (Bower *et al.*, 2000). Durante a recidiva da hepatite A, que também foi descrita por Gruer *et al.* (1982) e

Jacobson *et al.* (1985), alguns estudos identificaram o HAV no fígado (van den Anker *et al.*, 1988), nas fezes e aumento dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) (Sjogren *et al.*, 1987) nos pacientes com recaída clínica.

1.2.7.1. Hepatite Fulminante

A principal complicação da infecção pelo HAV é a hepatite fulminante (HF) que ocorre em menos de 1% dos casos de hepatite A. Um exemplo é a insuficiência hepática aguda (ALF) com encefalopatia que é rara, porém, com condição devastadora na qual ocorre uma severa disfunção hepática e rapidamente conduz à hemorragia e alterações no estado mental, frequentemente ocasionando óbito (Rezende *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2008). A incidência mais elevada ocorre entre crianças e idosos com doença hepática crônica (Akriviadis *et al.*, 1989). As razões para o desenvolvimento da insuficiência hepática e eventual progressão para hepatite fulminante em muitas crianças com hepatite A não são claras, porém, fatores do paciente podem ser importantes nesta progressão. O envolvimento de predisposição genética para o desenvolvimento da doença também não é conhecido (Ciocca, 2000).

Entre as opções de tratamento disponíveis, o transplante de fígado é o mais aceito e com a melhoria nos cuidados intensivos, a taxa de sobrevivência é de 64% (Ciocca, 2000). Vários estudos na América Latina, Ásia e Europa têm indicado que a infecção aguda do HAV pode ser o maior causador de ALF em crianças, adolescentes e adultos acima dos 50 anos de idade (O'Grady, 1992; Arora *et al.*, 1996; Debray *et al.*, 1997; Ciocca, 2000; Shah *et al.*, 2000; O'Grady, 2007). Estudos conduzidos na África do Sul, Índia, Paquistão e América Latina demonstraram que o HAV é o agente etiológico em 38 a 50% dos casos de hepatite fulminante em crianças (Arora *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2000; Ciocca *et al.*, 2007). A taxa de mortalidade observada nos pacientes com hepatite fulminante induzido pelo HAV é de aproximadamente 40% (Shah *et al.*, 2000; Ciocca *et al.*, 2007).

1.2.8. **Patogenia e história natural da infecção**

A patogênese da infecção hepática pelo HAV tem sido estudada em infecções experimentais de primatas não-humanos (Pinto *et al.*, 2002; Amado *et al.*, 2010) e infecções naturais em humanos (Vital *et al.*, 2006). Logo após a ingestão oral do

HAV, os destinos dos vírions são o estômago e o intestino (Asher *et al.*, 1995), chegando ao fígado através do sistema porta hepático. HAV é um vírus hepatotrópico; replica no fígado, produz viremia, é excretado na bile e é detectado nas fezes de pessoas infectadas. As fezes podem conter até 10^9 partículas virais por grama e é a fonte primária de infecção pelo HAV (Skinhoj *et al.*, 1981; Tassopoulos *et al.*, 1986). Como regra geral, o pico da eliminação viral nas fezes ocorre antes do início da icterícia, dos sintomas ou da elevação das enzimas hepáticas (Skinhoj *et al.*, 1981; Tassopoulos *et al.*, 1986) e decai após o aparecimento da icterícia (Figura 1.5). Comparado aos adultos, crianças e bebês podem excretar o vírus por períodos mais longos, ou seja, até vários meses após o início da doença clínica (Chiriaco *et al.*, 1986; Tassopoulos *et al.*, 1986).

A viremia se inicia uma a duas semanas após a exposição com o HAV e persiste durante o período da elevação das enzimas hepáticas, baseado em estudos em humanos e chimpanzés experimentalmente infectados (Krugman *et al.*, 1962; Giles *et al.*, 1964; Margolis *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1989; Lemon, 1994; Asher *et al.*, 1995). A concentração do vírus no soro é de 2 a 3 $\log_{10}$ unidades menores que nas fezes (Cohen *et al.*, 1989; Lemon, 1994; Bower *et al.*, 2000). Bower *et al.* (2000) descreveram que HAV estava presente de três a quatro semanas antes do início do aparecimento da icterícia e a concentração do vírus era maior durante o período que antecede o início da elevação das enzimas hepáticas. A viremia pode estar presente por um período muito mais longo durante a fase convalescente da hepatite A, do que os dados anteriormente relatados (Yotsuyanagi *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1997; Bower *et al.*, 2000), apesar da baixa concentração do vírus eliminada nesse período.

O vírus também é excretado na saliva de muitos pacientes com hepatite A (Mackiewicz *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2008). Contudo, não há dados epidemiológicos sugerindo que a saliva seja uma significativa fonte de transmissão de HAV (Nainan *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral às proteínas estruturais do HAV ocorre antes do início dos sintomas. Anticorpos IgM para o HAV (IgM anti-HAV) são detectáveis antes ou no início da doença clínica, reduzindo em cerca de três a seis meses, tornando-se indetectáveis pelos testes de diagnóstico comerciais (Kao *et al.*, 1984). Anticorpos IgG para o HAV (IgG anti-HAV) aparecem logo após, persistindo por anos depois da infecção e conferem imunidade ao longo da vida (Skinhoj *et al.*, 1977). A IgA também é produzida durante a infecção por um tempo limitado

(Locarnini *et al.*, 1980; Angarano *et al.*, 1985). O papel da IgA na resposta contra o HAV ainda é desconhecido. Ao contrário de outros membros da família *Picornaviridae*, HAV não parece suscitar uma resposta imune intestinal eficaz (Stapleton *et al.*, 1991).

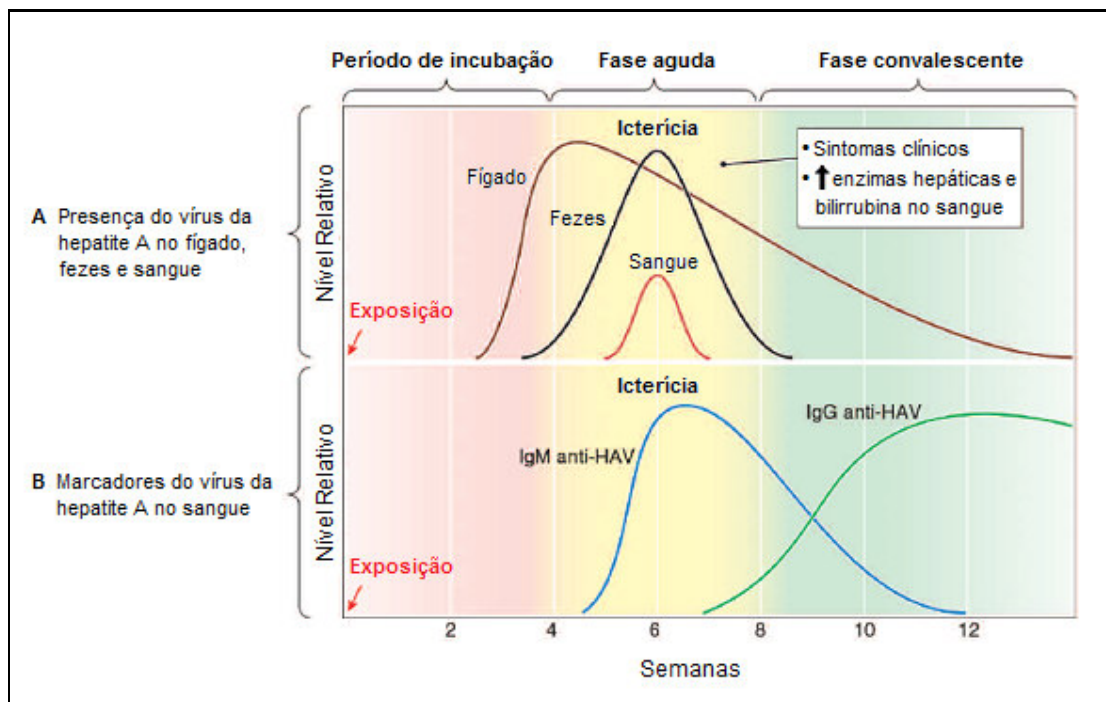


Figura 1.5 – Fases clínicas e marcadores séricos da infecção. **A:** A infecção do fígado é rapidamente seguida pelo aparecimento do vírus nas fezes. **B:** A icterícia ou outros sintomas da infecção aguda são acompanhados pelo aparecimento de anticorpos IgM no sangue na fase aguda. O aparecimento de anticorpos IgG sinaliza a recuperação e imunidade contra reinfecções. (Adaptado de Dentinger, 2009)

Os anticorpos IgG e IgA anti-HAV são detectados no soro, saliva, urina e fezes (Locarnini *et al.*, 1978, 1980; Perry *et al.*, 1992; Joshi *et al.*, 2002). Testes de saliva foram relatados como uma alternativa aos testes sorológicos convencionais para o anti-HAV, devido a sua simplicidade na coleta da amostra (Jacobson *et al.*, 1995; Ochnio *et al.*, 1997; Oba *et al.*, 2000). Vários estudos têm demonstrado os benefícios da aplicação de testes de saliva como uma ferramenta de triagem em investigações de surtos e estudos epidemiológicos (Hurni *et al.*, 1993; Jacobson *et al.*, 1995; Laufer *et al.*, 1995).

1.2.9. Diagnóstico

1.2.9.1. Deteção de anticorpos HAV-específicos

A resposta imune humoral desempenha um papel fundamental no diagnóstico da infecção pelo HAV e na diferenciação da hepatite A de outros tipos de hepatites virais. Há uma série de testes comerciais disponíveis no mercado para detecção de IgM anti-HAV e anti-HAV total (Jindal *et al.*, 2002; Poddar *et al.*, 2002; Dignani *et al.*, 2003). As imunoglobulinas IgM, IgA e IgG anti-HAV geralmente estão presentes no início dos sintomas da doença (Nainan *et al.*, 2006) (Figura 1.5). A hepatite causada pelo vírus da hepatite A é clinicamente indistinguível da doença causada pelas outras hepatites virais (HBV, HCV, HDV e HEV). No teste sorológico, a presença de anticorpos da classe IgM é fundamental para fazer o diagnóstico (Stapleton *et al.*, 1995).

No diagnóstico, IgM anti-HAV tem sido usada como o principal marcador de infecção aguda (Cuthbert, 2001), composta principalmente de anticorpos contra proteínas do capsídeo. Vários métodos têm sido usados para detectar classes de anticorpos vírus-específicos, incluindo radioimunoensaio (Purcell *et al.*, 1976), ligação imunoquímica (Huang *et al.*, 1979), ELISA (Delem, 1992), e imunoblotting (Wang *et al.*, 1996). O ELISA IgM anti-HAV está disponível comercialmente (Poddar *et al.*, 2002). Os testes de diagnóstico comerciais são ajustados de tal maneira que, apesar de os anticorpos IgM estarem presentes por longos períodos de tempo, a pequena concentração encontrada de quatro a seis meses depois do início da infecção não produz resultado positivo no teste (Stapleton, 1995).

Infecções prévias pelo HAV já resolvidas ou mesmo contato do hospedeiro com o vírus são diagnosticadas pela presença de IgG anti-HAV no soro. No entanto, testes comerciais competitivos detectam anticorpos totais (anticorpos IgG e IgM) circulantes. A associação da presença de anticorpos anti-HAV totais e a ausência de anticorpos IgM anti-HAV pode ser usada para diferenciar entre infecção passada e infecção atual (Nainan *et al.*, 2006).

1.2.9.2. Deteção de antígenos

O vírus da hepatite A cresce em vários tipos de células de origem humana e não-humana, incluindo células primárias e secundárias de rim de macaco verde Africano (Daemer *et al.*, 1981) e células de rim de macacos rhesus (FRhK-4)

(Flehmg, 1980). Em contraste à maioria dos picornavírus, o HAV de origem humana requer um longo período de adaptação antes de crescer em cultura de células, e uma vez adaptado, produz uma infecção persistente e torna-se atenuado (Feinstone *et al.*, 1983). O HAV replica em cultura de célula sem sinais citopáticos da infecção, fato que determina a utilização de testes imunológicos ou moleculares para detectar o vírus em cultura (Siegl *et al.*, 1984). Os métodos comumente usados para quantificar a infectividade são: ensaio de radio imunoensaio (Lemon *et al.*, 1983), ensaio foco fluorescente, radioimunoensaio *in situ* (Siegl *et al.*, 1984) e hibridização *in situ* (Jiang *et al.*, 1987).

As técnicas de detecção do ácido nucléico são mais sensíveis que imunoensaios para detectar o antígeno viral em amostras de diferentes origens (espécimes clínicas, amostras ambientais, comida e água). O HAV tem sido detectado com técnicas como polimorfismo de tamanhos de fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (Goswami *et al.*, 1997), polimorfismo conformacional da fita única (SSCP) (Goswami *et al.*, 1997), “Southern blotting” (Buti *et al.*, 2001) e transcrição reversa-PCR (RT-PCR) (Jansen *et al.*, 1990). A amplificação de RNA viral pela RT-PCR é atualmente o método mais sensível e amplamente utilizado para detecção do HAV (Nainan *et al.*, 2006).

O teste quantitativo baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real) revolucionou a detecção de ácidos nucléicos pela sua rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e minimização de contaminantes. Até tem sido aplicado para detecção e quantificação do HAV (Costa-Mattioli *et al.*, 2002a), e tem sido muito utilizado em laboratórios que necessitam liberar resultados em menos de 36 horas, como nos casos de surtos. A rapidez da técnica é devida à redução dos ciclos de amplificação e à eliminação de procedimentos de detecção pós-PCR (Nainan *et al.*, 2006). O sequenciamento dos ácidos nucléicos de regiões selecionadas do genoma do HAV tem sido utilizado para determinar a relação genética dos isolados (Jansen *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1992).

1.2.10. Epidemiologia

No mundo, a endemicidade da infecção pelo HAV varia de acordo com os padrões de higiene regional; a maior prevalência de infecções ocorre em regiões com baixos níveis sócio-econômicos (Bell, 2002). Os Estados Unidos geralmente têm baixa endemicidade de infecções pelo HAV, apesar de altas taxas de infecções

ocorrerem em certas populações (Bell *et al.*, 1998; CDC, 1999). Embora a incidência de hepatite A venha diminuindo ao longo da última década, principalmente por causa da vacinação (Bialek *et al.*, 2004; Wasley *et al.*, 2005), esta continua a ser uma doença frequentemente relatada. Em 2003, 7.653 casos de hepatite A foram notificados ao CDC (CDC, 2004), que quando corrigido por infecções assintomáticas ou não-notificadas (Armstrong *et al.*, 2002; Wasley *et al.*, 2005), representa um número estimado de 36.700 casos e 79.600 infecções.

Vários padrões de infecção da hepatite A têm sido descritos, variando em relação ao nível de desenvolvimento sócio-econômico (Gust, 1992; Jacobsen *et al.*, 2004). Em áreas com alta endemicidade, o HAV é transmitido principalmente pelo contato pessoa a pessoa, e embora 90% das crianças até dez anos sejam infectadas, seu curso é benigno. Esse padrão epidemiológico é típico na África e no Oriente Médio, bem como em alguns países da América Latina e da Ásia. Em áreas de endemicidade moderada, a incidência da infecção pelo HAV é alta e ocorre com maior frequência no final da infância, adolescência ou em adultos jovens. Nessas áreas, os surtos são mais comuns, a transmissão ocorre pelo contato pessoa a pessoa ou através do consumo de alimento ou água contaminado. Este padrão de transmissão tem sido visto em regiões anteriormente endêmicas na América Latina e Ásia, onde as taxas de soroprevalência média vêm declinando nos últimos anos (Tanaka, 2000; Kang *et al.*, 2004; Vitral *et al.*, 2006). Em países desenvolvidos, a endemicidade do HAV é baixa e as infecções ocorrem majoritariamente entre os adultos jovens (Pham *et al.*, 2005). O vírus é transmitido principalmente através do consumo de alimento e água contaminado, entretanto, muitos casos de transmissão pessoa a pessoa tem sido descritos. Nestas áreas, os surtos também são comuns (Vitral *et al.*, 2006). Em áreas de baixa endemicidade, a taxa da doença também é bem pequena e a infecção ocorre em adultos. Casos de infecções são esporádicos e as pessoas geralmente são contaminadas durante viagens para áreas endêmicas. Esse padrão pode ser observado na Escandinávia (CDC, 1999).

A fonte mais comum de infecção é a doméstica ou contatos íntimos com uma pessoa infectada (Bell *et al.*, 1998; CDC, 1999). Outras fontes potenciais de infecções incluem homens que têm relação sexual com homens (apesar de não ter alta prevalência, alguns surtos de hepatite A na Europa e nos Estados Unidos foram associados a esta causa) (Henning *et al.*, 1995; Sundkvist *et al.*, 1997; Bruisten *et al.*, 2001; Nainan *et al.*, 2005), viagens de pessoas de regiões com baixa

Prevalência de anti-HAV

- Alta
- Alta/Intermediária
- Intermediária
- Baixa
- Muito baixa

1.2.11. Prevenção

27

crianças menores que cinco anos de idade eram soropositivas para o HAV no Brasil, México e Argentina, e 11% eram soropositivas no Chile (Tapia-Conyer *et al.*, 1999), com variações regionais dentro dos países (Vital *et al.*, 2006). Essa mudança de perfil epidemiológico ocasionou menos casos de infecção pelo HAV na infância, mais surtos ocorrendo em populações mais velhas susceptíveis, com o aumento de morbidade e mortalidade (Tanaka, 2000; Ruttimann *et al.*, 2002). Este fato se deve à eficácia da vacina para hepatite A. Reduções significantes na incidência da doença têm ocorrido nos Estados Unidos (Wasley *et al.*, 2005) e Israel após a introdução da vacinação de rotina das crianças, com reduções drásticas nas taxas de infecção (Dagan *et al.*, 2005). Ademais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que em países de endemicidade intermediária, onde o HAV representa um problema de saúde pública, que a vacinação em larga escala deve ser considerada um suplemento à melhoria das condições sanitárias (WHO, 2000).

1.3. Justificativa

A detecção tecidual do vírus da hepatite A é uma ferramenta de importância para a pesquisa de casos de hepatite de difícil esclarecimento, principalmente quando os títulos de IgM no soro do paciente são baixos e indetectáveis aos testes comerciais, fato que ocorre em casos de hepatite fulminante. Atualmente o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia/IOC em conjunto com o Laboratório de Tecnologia Viroológica/ Biomanguinhos se defronta com esta dificuldade logística, pois uma das formas de comprovação da eficácia de uma nova vacina em fase de teste é o desafio com vírus selvagem (HAV) de primatas não-humanos, previamente vacinados. A comprovação da resposta protetora pela vacina é obtida pela ausência de antígenos virais no fígado geralmente associados à lesão necroinflamatória. A IgY seria de fundamental importância, uma vez que atualmente é pequena a disponibilidade comercial de anticorpos contra o vírus da hepatite A. Além disso, quando este é disponível, geralmente seu custo é elevado e a qualidade nem sempre é adequada para execução de testes. Somente dois anticorpos específicos para o vírus da hepatite A são comercializados, um norte-americano (US Biological, Swampscott, MA, USA) e um alemão (Mediagnost, Reutlingen, BW, Alemanha), ambos são monoclonais.

As dificuldades encontradas anteriormente para detecção do antígeno HAV tecidual empregando anticorpos monoclonais comerciais e a fraca resposta de roedores e lagomorfos ao antígeno HAV, induziu a necessidade de pesquisa de fontes alternativas e mais eticamente aceitáveis de produção de anticorpos específicos contra o vírus da hepatite A. Neste trabalho levamos em consideração a hipótese de que a distância filogenética em relação aos mamíferos promoveria menor reação cruzada com proteínas teciduais de mamífero, maior avidéz, além da maior facilidade na obtenção, maior rendimento e custo reduzido.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ✓ Elaborar um método de detecção do vírus da hepatite A (HAV) através de anticorpos anti-HAV da classe IgY produzidos em frangas imunizadas.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Produzir anticorpo policlonal anti-HAV em frangas poedeiras imunizadas com o vírus da hepatite A.
- ✓ Avaliar os adjuvantes IFA e CpG-ODN na produção de anticorpos específicos.
- ✓ Padronizar o diagnóstico do vírus da hepatite A em tecido hepático utilizando IgY como anticorpo primário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Acomodação, alimentação e procedimentos com os animais

O projeto envolveu vinte frangas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) clinicamente saudáveis da raça ISA Brown provenientes de matrizeiros comerciais, pesando de 0,143 a 0,220 Kg. As aves foram mantidas em acomodações adequadas no Laboratório de Bioclimatologia da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO), Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. Uma semana antes de começar o experimento, todas as aves foram colocadas individualmente em gaiolas apropriadas, com regime de 12 horas de luz para 12 horas de escuridão, temperatura de 24 °C e umidade relativa do ar de 70-80%. As frangas foram vacinadas contra Fowlpox vírus e doença de New Castle. Água e ração eram oferecidas *ad libitum* sendo o tipo de ração adequado ao estágio de vida que animais se encontravam. Um mês após cada imunização contra hepatite A, as aves eram gentilmente manipuladas a fim de monitorar o peso corporal e coletar pequena quantidade de sangue da veia da asa para confirmar a eficácia da imunização.

As galinhas, com 228 dias de vida, foram eutanaziadas por exsanguinação sob anestesia profunda por barbituratos, dezesseis semanas após o início da postura dos ovos. Durante o sacrifício das aves, foram coletados fragmentos do fígado, bursa de Fabricius, rins e baço, fixados em Formalina 10% tamponada e armazenados em blocos de parafina para análise histológica convencional por microscopia de luz. A necrópsia foi feita no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFESO, Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. Todos os procedimentos experimentais foram em acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (Wolfle *et al.*, 1996).

O projeto foi julgado pelo Comitê de Ética no Trato com Animais (CETA) da UNIFESO, sendo decidido que este projeto não necessitava de submissão ao comitê de ética, pois os procedimentos que foram utilizados nas aves não causam nenhum tipo de sofrimento às mesmas.

3.2. Desenho experimental

As vinte aves foram divididas em cinco grupos (I-V) com diferentes protocolos de imunização: Grupo I – Uma quantidade de 200 µL da vacina comercial pediátrica para HAV (Merck & Co. Inc., West Point, PA, USA) associada com 20 µL CpG-ODN (1 mg/mL) (5'-TCGTCGTTTGTCTTTTGTCTT 3', BioCorp Inc., Montreal, Canadá ou Integrated DNA Technologies, USA) (Rankin *et al.*, 2001); Grupo II – 200 µL da vacina comercial pediátrica para HAV; Grupo III – Uma quantidade de 100 µL de HAV associado com 100 µL Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) e 20 µL de CpG-ODN; Grupo IV – 100 µL de HAV associado com 100 µL Adjuvante Incompleto de Freund (IFA); Grupo V – 100 µL de Adjuvante Incompleto de Freund, como controle negativo. A tabela 3.1 apresenta o esquema de inoculação dos grupos. O HAV administrado nas aves foi produzido em cultura de célula (FRhK-4) com 5×10^7 cópias RNA/mL. O volume total de 220 µL do inóculo foi administrado via intramuscular no músculo peitoral em todos os grupos. No total, foram três imunizações as quais ocorreram aos 21, 53 e 98 dias de vida das aves.

Tabela 3.1 - Esquema de imunização de cada grupo.

Grupo	Inóculo
I	Vacina + CpG-ODN
II	Vacina
III	HAV + IFA + CpG-ODN
IV	HAV + IFA
V	IFA

CpG – Sequência nucleotídica; HAV – Vírus da hepatite A; IFA – Adjuvante Incompleto de Freund

3.3. Produção do vírus da hepatite A

3.3.1. Cultura de células FRhK-4

As células utilizadas neste projeto foram células fetais de rim de macaco rhesus do gênero *Macaca mulata*, linhagem FRhK-4 contínua. O meio de cultura utilizado para propagação foi o meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®, Eugene, OR, USA), 2,5% a 4,4% de NaHCO₃ (Merck & Co. Inc., West Point, PA, USA) gaseificado, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de gamicina (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA).

3.3.2. Propagação e liberação do vírus da hepatite A

O vírus da hepatite A utilizado neste projeto foi isolado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) (HAF-203 isolado Brasileiro, acesso: GeneBank AF268396) (Gaspar *et al.*, 1993). Para a propagação do HAV, células FRhK-4 foram inoculadas com 1,0 mL do HAV (1×10^5 cópias RNA/mL) e incubadas em estufa a 37°C durante uma hora, para adsorção. Posteriormente, o inóculo foi retirado para adição de 75 mL do meio de manutenção (meio 199 suplementado com 2% de soro fetal bovino). As garrafas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 11 dias. Ao término do tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células rompidas por cinco ciclos de congelamento e descongelamento em 3,0 mL de PBS pH 7.4 para liberação das partículas virais. O material coletado foi centrifugado por 10 minutos a 6.000 *g*, para retirada dos restos celulares. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -70°C.

3.4. Sorologia das aves

Um mês após cada imunização, foi realizada coleta de sangue das aves para acompanhar o aumento de anticorpos específicos anti-HAV no soro. O sangue foi centrifugado a 735 *g* por 6 minutos e o soro foi transferido para um tubo de 1,5 mL e armazenado a -20°C. O método utilizado para detecção dos anticorpos específicos foi o ELISA anti-HAV total (BioKit, S.A., Barcelona, Espanha), de kit comercial, e se baseava em reação de competição. Em cada poço havia antígeno do HAV preso à placa. Na primeira etapa do teste, adicionamos 10 µL da amostra de soro das galinhas e 100 µL do conjugado do kit (IgG anti-HAV conjugada à peroxidase), enquanto nos poços dos controles eram adicionados os soros de controle negativo e positivo ao invés da amostra. A incubação era de uma hora em estufa a 37°C. Após a incubação, o conteúdo dos poços era descartado, os poços eram lavados e em seguida adicionado a solução de substrato-cromógeno (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO)). Esta incubação tinha duração de 30 minutos em temperatura ambiente. Logo após, a reação era interrompida com solução de bloqueio da reação (ácido sulfúrico) e a placa era lida no leitor de ELISA com filtro de mensuração de 450 nm e filtro de referência de 620 nm para liberação do resultado que era expresso em densidade ótica (OD).

3.5. Método de purificação da IgY

Os ovos foram coletados desde a primeira postura e a coleta foi encerrada com dezesseis semanas de coleta. Todos os ovos coletados na mesma semana faziam parte de um “pool” de ovos, ou seja, todos os ovos purificados da mesma semana formavam uma só amostra (por grupo de imunização). O total de ovos recolhidos de todos os grupos neste período foi de 1.406 unidades e ficaram armazenados em geladeira a 4°C até serem purificados para obtenção da IgY.

O método de purificação da IgY empregado foi a precipitação em polietileno glicol (PEG) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) desenvolvido por Polson *et al.*, (1985), procedimento que consiste em quatro etapas de precipitação da gema do ovo com PEG 6.000 através de centrifugação para separação das proteínas. Para iniciar o processo, a uma parte de gema de ovo foram adicionados 3,5% (p/v) de PEG 6.000 e quatro partes de tampão fosfato salina (PBS) (pH 7,5). A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada por 10 minutos (14.000 *g*) a 25 °C.

Após a centrifugação, a solução estava dividida em três fases (Figura 3.1). A fase semi-sólida (precipitada) composta de outras proteínas que não a IgY foi descartada. As fases de gordura (sobrenadante) e IgY (fase intermediária) foram decantadas por um funil com papel de filtro. A esta solução decantada, adicionamos PEG 6.000 a uma concentração final de 12% (p/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos; posteriormente, foi centrifugada novamente (14.000 *g*) por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante (gordura) foi descartado e o precipitado (IgY) foi dissolvido novamente em PBS até o volume de 35mL, com adição de PEG 6.000 a uma concentração final de 12% (p/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos. Posteriormente, repetiu-se a centrifugação (14.000 *g*) por 10 minutos a 25 °C. Após, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado dissolvido em 2,5 mL de etanol gelado 50% e 2,5 mL de PBS pH 7,4, para retirar o PEG residual. A solução foi centrifugada (10.000 *g*) por 10 minutos a -5°C, descartando o sobrenadante ao final (PEG residual). Para finalizar a purificação, o precipitado contendo aproximadamente de 6 a 12 mg/mL de IgY foi ressuspensionado em 2,5 mL de PBS pH 7,4.

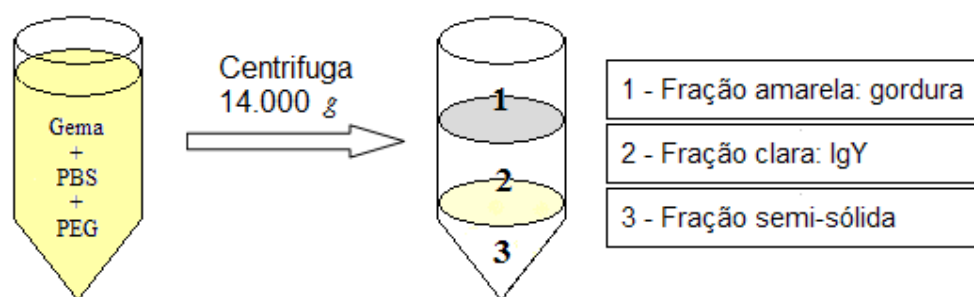


Figura 3.1 – Esquema representativo da primeira etapa de centrifugação, onde a mistura de gema do ovo, PBS e PEG 6.000 são divididas em três frações e posterior formação do gradiente após centrifugação.

3.6. Quantificação da IgY

Com o intuito de conhecer a concentração de IgY purificada da gema do ovo, foram realizados três procedimentos, a espectrofotometria das proteínas totais purificadas, a titulação da IgY pelo método de ELISA de kit comercial para detecção das imunoglobulinas anti-HAV totais e a técnica de neutralização em cultura de células FRhK-4. A IgY purificada do Grupo V, das aves não imunizadas com antígenos, era sempre utilizada como controle negativo.

3.6.1. Espectrofotometria

Na espectrofotometria, o purificado da gema dos ovos de todos os grupos foi aferido em aparelho de espectrofotometria no comprimento de onda de 280nm e o resultado gerado foi a concentração total das proteínas presentes no purificado da gema, não somente a IgY. A aferição foi feita nas semanas 1, 5, 9, 13 e 16.

3.6.2. Titulação

Na avaliação por ELISA, o purificado foi diluído em várias concentrações ($1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ e $1:10^6$) e realizado o ELISA de kit comercial (Biokit, S.A., Barcelona, Espanha) para detecção de anticorpo anti-HAV para todas essas diluições em todos os grupos. O procedimento deste ELISA é igual ao realizado com o soro das aves, a única diferença é que no lugar do soro, a amostra adicionada foi o purificado da gema do ovo. Foi observado até qual diluição a amostra apresentou

resultado positivo no ELISA. Na titulação, a aferição também foi feita nas semanas 1, 5, 9, 13 e 16.

3.6.3. Neutralização *in vitro* do HAV pela IgY da gema

Com o objetivo de avaliar a especificidade da IgY purificada da gema, foi realizado um teste de neutralização do HAV pela IgY em cultura de células. Várias diluições da IgY purificada do grupo III na semana 9 (1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ e 1:10⁵) foram incubadas com 1x10⁵ cópias de RNA/mL de HAV a 37 °C por uma hora. Assim, este inóculo que era previamente adaptado às células FRhK-4, foi adicionado em uma cultura de células de FRhK-4 e mantido durante 10 dias a 37 °C com 2% de CO₂. A replicação do HAV foi avaliada pela quantificação na técnica de PCR em tempo real, como descrito por de Paula *et al.* (2009).

3.7. Caracterização da IgY pela eletroforese (SDS-PAGE) e “Western Blotting”

A caracterização da imunoglobulina purificada da gema dos ovos foi realizada pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e “Western Blotting”. A eletroforese foi realizada em uma cuba de mini gel da Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Em cada procedimento, dois géis eram corridos, um gel com o purificado da gema (grupos I, II, III, IV e V) e outro gel com as proteínas do vírus da hepatite A (HAF-203) (Gaspar *et al.*, 1993). Em ambos os géis foi corrido o padrão de peso molecular pré-corado “Kaleidoscope” (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Antes do procedimento, o purificado e o vírus eram diluídos em 1:4 (uma parte do purificado ou de vírus, uma parte de PBS pH 7,4 e duas partes de tampão de desnaturação com β-mercaptoetanol - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e desnaturados por 5 minutos a 95 °C. Após a desnaturação, as amostras foram corridas em gel poliacrilamida Bis-Tris 10% a 200 V por aproximadamente 40 minutos, tempo em que o corante atingia o final do gel. O gel com as proteínas da IgY era corado com “Comassie Blue” 0,1% (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) para visualizar as proteínas presentes no purificado e o gel com as proteínas do vírus era submetido à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose pelo método de “Western Blotting”. Com a avaliação das proteínas

através do perfil de peso molecular das cadeias leve e pesada, inferimos se a imunoglobulina presente seria ou não a IgY.

A transferência ocorria a 100 V por 90 minutos e após, a membrana era incubada em solução de bloqueio 5% “overnight” a 25°C sob leve agitação. Em seguida, a membrana era lavada com Tampão Fosfato Salina Tween-20 (PBST) 0,05% três vezes por cinco minutos em cada lavagem. A membrana era cortada em tiras iguais de forma que cada tira continha todas as proteínas do vírus. Cada tira era incubada com um grupo da IgY na diluição de 1:5.000 em PBST 0,05% por 4 horas a 37°C sob leve agitação. Após a incubação, as tiras eram lavadas três vezes com PBST 0,05% por cinco minutos cada. A segunda incubação era com IgG anti-IgY na diluição de 1:5.000 com PBST 0,05% por uma hora a 37°C. As três lavagens em PBST 0,05% eram repetidas. Na etapa seguinte, a incubação era de proteína A conjugada com peroxidase na diluição de 1:500 com PBST 0,05% a 37°C sob leve agitação durante uma hora. Após a incubação, as tiras eram lavadas três vezes com PBST 0,05% por cinco minutos cada. A solução de revelação (5 mg DAB, 100 mL CoCl₂, 20 mL de H₂O₂ 30 volumes e PBS pH 7,4 *q.s.p.* para cada tubo) foi feita durante a última lavagem. O PBS da última lavagem foi descartado e as bandas apareceram com as tiras mergulhadas na solução de lavagem. A reação foi parada pela adição de água destilada.

3.8. Detecção de hepatite A em tecido hepático

A IgY anti-HAV produzida em gema de ovo foi aplicada na técnica de imunofluorescência indireta para detecção do vírus da hepatite A em cortes histológicos de fígados congelados. O estudo envolveu quatro diferentes amostras de fígado a serem testadas pela técnica da imunofluorescência indireta: duas biópsias de fígado obtidas de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*), uma de macaco inoculado com vírus da hepatite A e uma de macaco não-infectado, um fígado de humano com hepatite fulminante de etiologia viral pelo HAV, e um fígado de humano com hepatite fulminante sem etiologia viral (controle) (Tabela 3.2). Os fígados de macaco cynomolgus são provenientes de um estudo anterior do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV/ IOC/FIOCRUZ) (Amado *et al.*, 2010) e os fígados de humanos são provenientes de outro projeto que estuda casos de hepatite fulminante (dos Santos *et al.*, 2009). Para a confecção das

lâminas com os cortes, as amostras de fígado congeladas foram emblocadas em resina de Tissue-Tek® (Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, IN, USA) em baixas temperaturas (abaixo de 0°C). Em seguida, os cortes histológicos foram cortados em criostato com espessura de 4 µm, fixados com acetona P.A. gelada e congelados à -70°C. Em cada lâmina montada havia três cortes histológicos.

Tabela 3.2 – Amostras de fígado de indivíduos com diagnóstico previamente conhecido utilizadas para testar os anticorpos IgY anti-HAV na detecção do antígeno através da técnica de imunofluorescência indireta.

Amostras de fígado	Infectado pelo HAV
Primata não-humano	Sim
Primata não-humano (controle)	Não
Humano (Hepatite Fulminante A)	Sim
Humano (Controle)	Não

A primeira etapa da técnica de imunofluorescência era o bloqueio com solução de albumina de soro bovino (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% e leite desnatado Molico® 1% durante 2 horas e 30 minutos em câmara úmida a 37°C. A etapa seguinte era da incubação com anticorpo primário IgY anti-HAV a 4°C “overnight”. A IgY utilizada como anticorpo primário era inicialmente do grupo III (HAV, IFA e CpG-ODN) e posteriormente do grupo I (vacina comercial e CpG-ODN). A IgY do grupo III foi testada primeiro, pois este grupo apresentou títulos maiores que os demais grupos. O anticorpo secundário anti-IgY Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) produzido em cabra, era incubado durante 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37°C. O esquema de ligação dos anticorpos primário e secundário pode ser observado na figura 3.2. A contra-coloração do corte histológico era feita com azul de Evans 1:10⁴ e a montagem com “Slow Fade®” em glicerol com marcação DAPI (Invitrogen, Eugene, OR, USA) e lamínula. A leitura da lâmina era feita em microscópio confocal LSM Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A detecção do HAV em tecido de fígado através da imunofluorescência indireta foi realizada sob várias diluições tanto do anticorpo primário como do anticorpo secundário. As diluições testadas do anticorpo do grupo I foram 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:300, enquanto as diluições testadas do anticorpo do grupo III foram 1:50, 1:75, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:600, 1:1.000, 1:2.000 e 1:5.000. As diluições do

anticorpo secundário utilizadas foram 1:700, 1:800, 1:900, 1:1.000, 1:1.200, 1:1.400 e 1:2.000. Os anticorpos eram diluídos em soro normal de cabra 5% (SNC) e PBS pH 7,2.

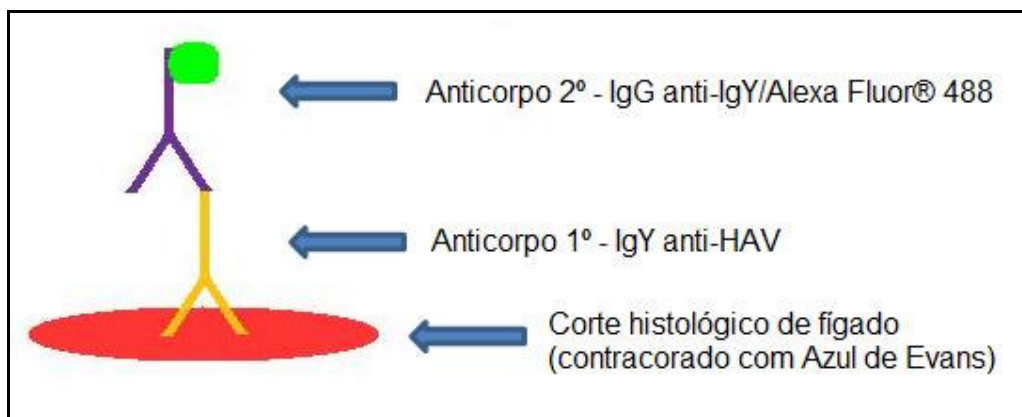


Figura 3.2 – Esquema de ligação da IgY ao tecido hepático e ligação com anticorpo secundário fluorescente.

As amostras de fígado dos macacos são provenientes do projeto intitulado de “Inovabio: Desenvolvimento de vacina inativada contra vírus da hepatite A” que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FIOCRUZ) com número de protocolo P-0257/05 (ANEXO I). As amostras de fígado dos humanos são provenientes do projeto “Avaliação dos aspectos imunopatológicos envolvidos em quadros de hepatite aguda com evolução para falência hepática fulminante” com aprovação nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da FIOCRUZ e da Universidade Federal do Rio de Janeiro com os números de protocolo 222/03 e 216/03, respectivamente, e termo de consentimento do Hospital Geral de Bonsucesso (ANEXO II).

3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa “GraphPad Prism” 5.0. Os dados foram relatados como média $\pm$ desvio padrão (DP) e os níveis de significância foram avaliados utilizando ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da imunização na biologia das frangas ISA Brown

Todas as frangas imunizadas apresentaram-se saudáveis e com boas condições clínicas durante todo o tempo de experimento. O local de imunização não conferia dor, desconforto ou dano tecidual. Com o objetivo de investigar o estresse causado nos animais e a toxicidade dos adjuvantes utilizados nas imunizações, o ganho de peso dos animais foi acompanhado e comparado entre os grupos durante o experimento. Na tabela 4.1, observamos a média de peso das aves em cada grupo por imunização. Nenhuma anormalidade foi observada no desenvolvimento das aves no período acompanhado. As características histopatológicas dos fragmentos de órgãos coletados na necropsia foram analisadas em todos os grupos estudados e observou-se degeneração gordurosa em algumas áreas do fígado, determinando a perda da arquitetura hepática nestas áreas. Algumas áreas de congestão hepática também foram encontradas. No baço, a congestão foi o principal achado em todos os grupos. As seções renais apresentaram arquitetura normal.

Tabela 4.1 – Média do peso corporal das aves após cada imunização.

	Ganho de peso corporal a cada imunização		
	1ª Imunização média g ($\pm$ DP)	2ª Imunização média g ($\pm$ DP)	3ª Imunização média g ($\pm$ DP)
Vacina + CpG-ODN	184,75 (20,4)	682,50 (33,7)	1430,00 (92,0)
Vacina	181,25 (26,8)	670,00 (63,7)	1508,33 (135,3)
HAV + IFA + CpG-ODN	161,00 (05,9)	638,75 (77,9)	1462,50 (108,0)
HAV + IFA	174,50 (26,6)	583,75 (87,2)	1333,75 (176,0)
IFA	165,50 (03,7)	616,6 (55,3)	1193,33 (66,5)

DP = Desvio Padrão

4.2. Caracterização da IgY anti-HAV específica no soro e na gema

4.2.1. Detecção de anticorpo anti-HAV no soro

Um mês após cada imunização realizamos testes de detecção de anticorpos específicos anti-HAV, não somente a imunoglobulina Y, mas qualquer imunoglobulina, uma vez que o teste utilizado foi o ELISA anti-HAV total. Em uma análise comparativa do título sérico entre os diferentes grupos imunizados, nós detectamos o maior título nos grupos III e IV após a primeira imunização ($p < 0,001$), estes dois grupos apresentaram soro-conversão mais rápida que os demais grupos. Os grupos I e II soro-converteram somente após a segunda imunização, e o grupo V não soro-converteu, pois não recebeu nenhum antígeno HAV nas imunizações, uma vez que este grupo era o controle negativo. O gráfico 4.1 demonstra a dinâmica da soro-conversão de cada grupo, onde o resultado é apresentado na razão CO/OD (“cut-off”/Densidade Ótica). Após a segunda e terceira imunizações não houve diferença estatística entre os grupos.

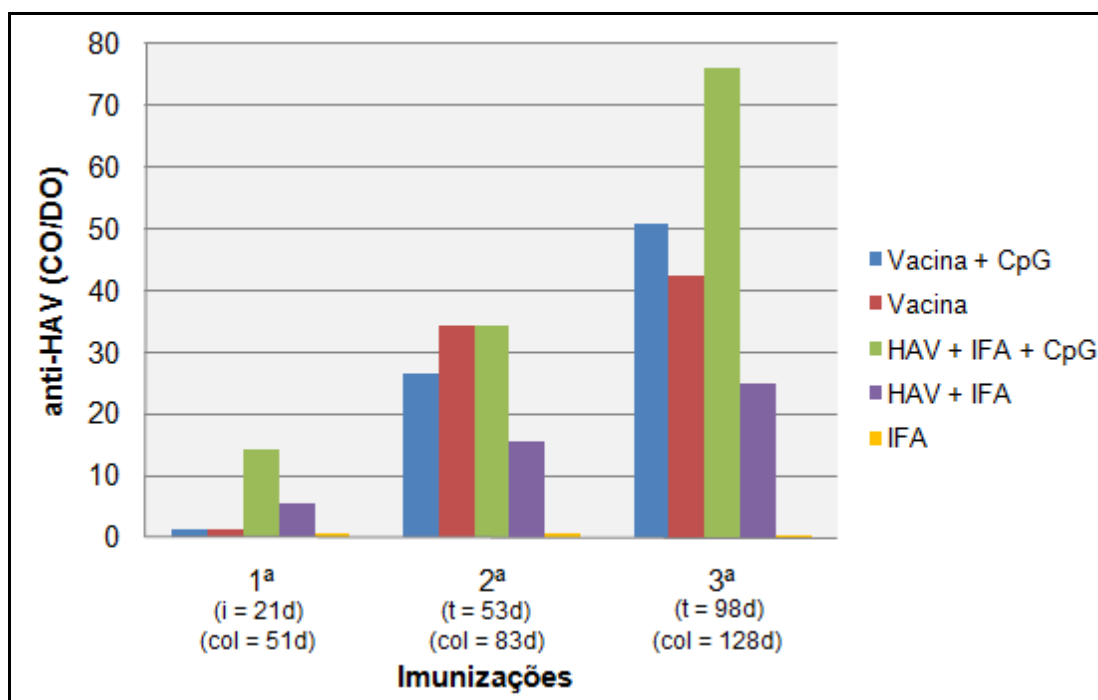


Gráfico 4.1 - Produção de anticorpos anti-HAV nos diferentes grupos imunizados. Cada coluna no gráfico representa a média de imunoglobulina anti-HAV das galinhas pertencentes a cada grupo. O gráfico é do teste de ELISA para detecção de anti-HAV total com resultado do “cut-off”/OD. t = dia da imunização; col = dia da coleta do sangue.

4.2.2. Espectrofotometria das proteínas totais

Na espectrofotometria observamos a quantidade total de proteínas purificadas da gema do ovo, não somente a IgY. O gráfico 4.2 demonstra a concentração das proteínas purificadas da gema dos ovos durante as semanas. A aferição foi feita em semanas equidistantes em relação ao tempo. Observou-se que na primeira semana a gema não apresentou muitas proteínas na maioria dos grupos, como exceção do grupo V. Na quinta semana, todos os outros grupos apresentaram aumento na concentração, enquanto o grupo V manteve a concentração quase igual a primeira semana. Na nona e décima terceira semanas, as concentrações foram similares entre os grupos, já na décima sexta semana (última semana de coleta dos ovos), os grupos III e IV mantiveram altas concentrações e os demais grupos decaíram bastante.

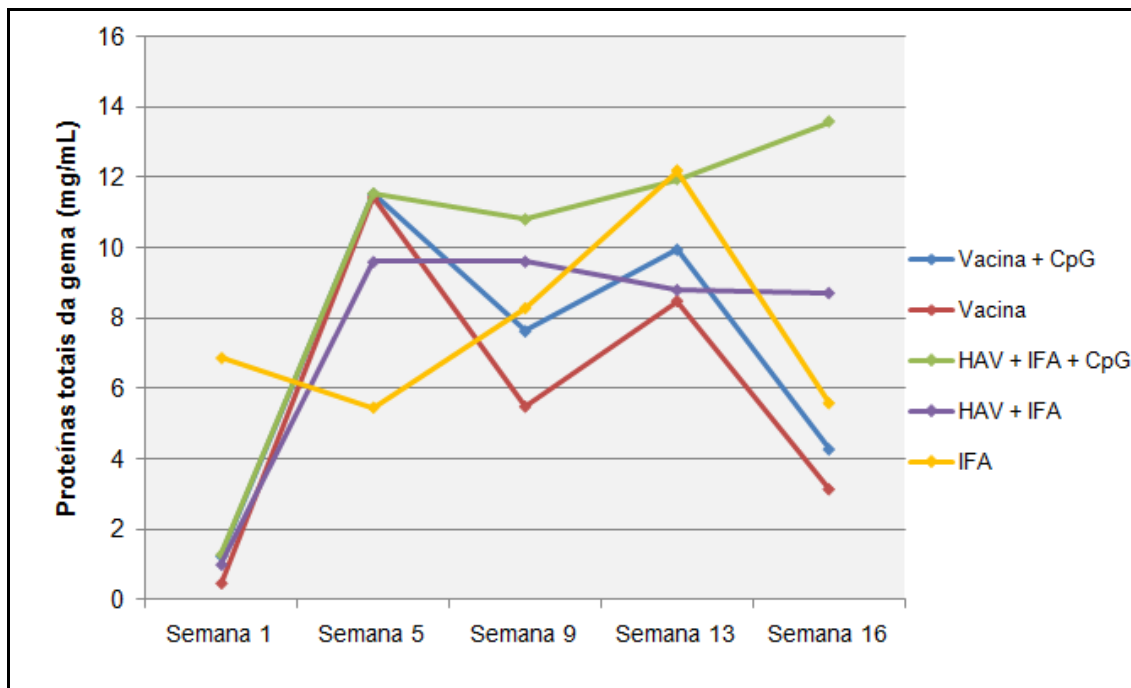


Gráfico 4.2 – Concentração das proteínas totais purificadas da gema em cada grupo nas 16 semanas de avaliação.

No gráfico 4.3, há demonstração da quantidade média semanal de proteínas purificadas em cada grupo, e o grupo III teve a maior quantidade de proteína purificada (média por semana - 9,827mg/mL). Os outros grupos mantiveram a média em torno de 6 a 7mg/mL.

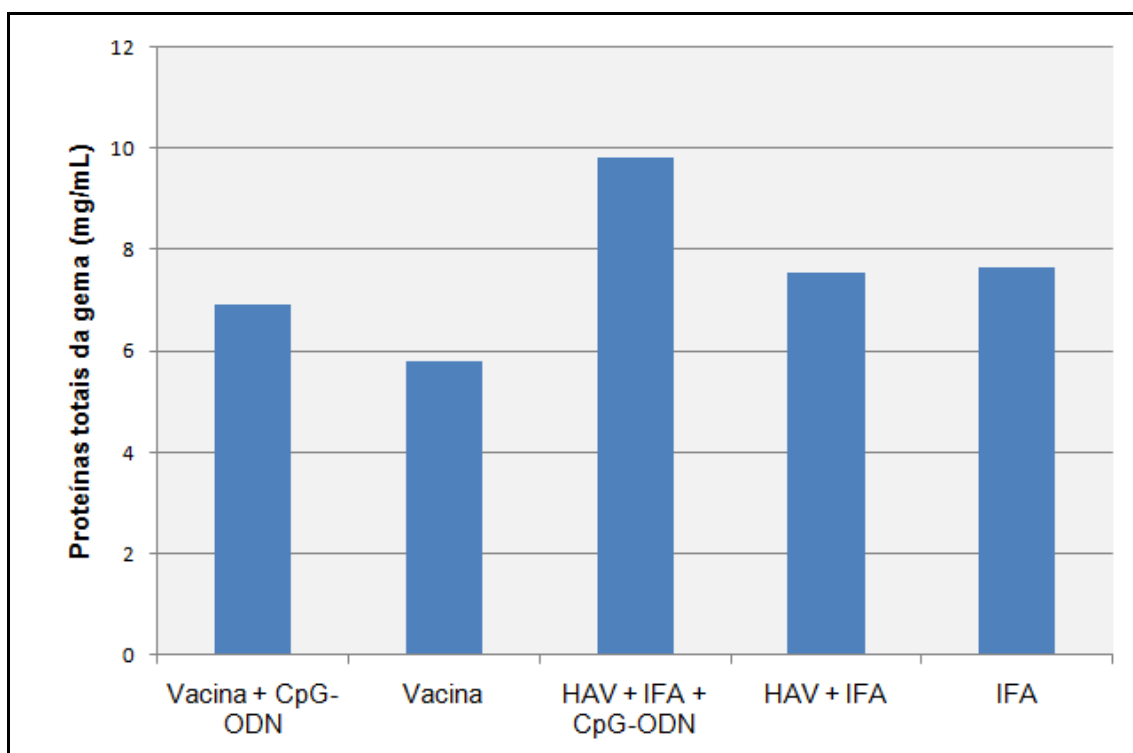


Gráfico 4.3 – Concentração média por semana das proteínas totais purificadas na gema em cada grupo.

4.2.3. Títulação da IgY anti-HAV

A titulação do purificado da gema dos ovos foi feita com o intuito de quantificar a IgY anti-HAV específica em cada grupo durante as dezesseis semanas. A quantificação foi estabelecida pela maior diluição da IgY que apresentou resultado positivo no ELISA. Nessa quantificação, o produto purificado do grupo III apresentou maior quantidade de IgY que os demais grupos, uma vez que houve resultado positivo até a diluição de 1:1.000. Os grupos I e IV tiveram resultado positivo até a diluição de 1:10, o grupo II até 1:100, enquanto o grupo V (controle) não apresentou resultado positivo em nenhuma concentração (Gráfico 4.4).

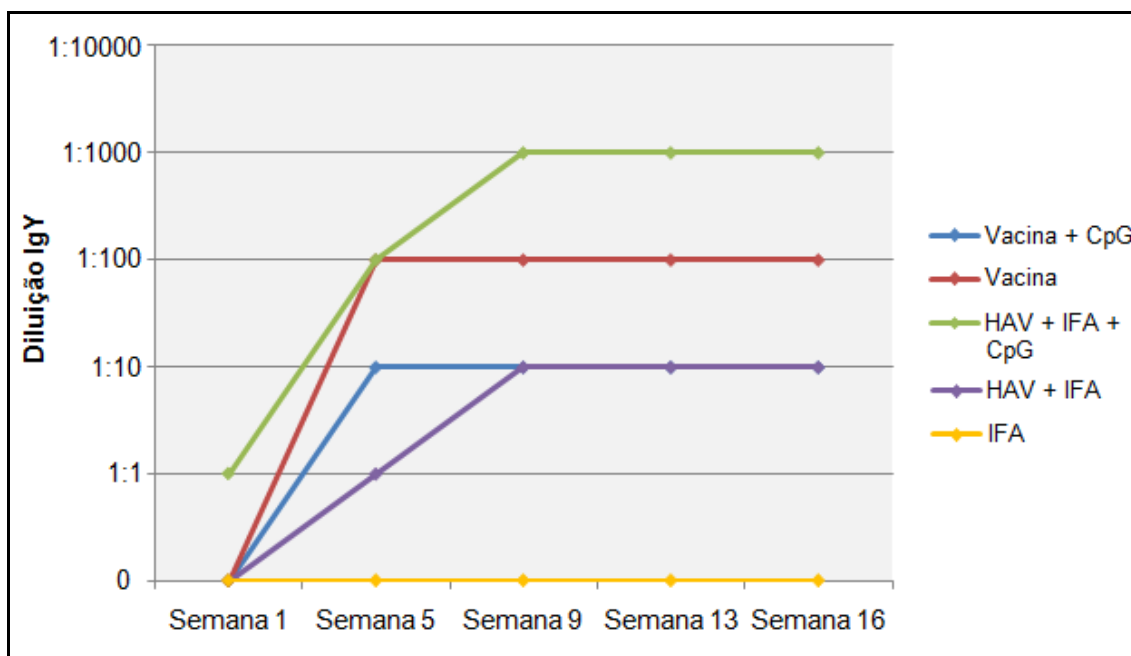


Gráfico 4.4 – Titulação da IgY purificada da gema dos grupos ao longo das semanas.

4.2.4. Neutralização

Para confirmar a especificidade e eficácia da IgY anti-HAV no bloqueio da penetração do HAV em células FRhK-4, o teste de neutralização *in vitro* foi realizado. Os resultados indicaram que os anticorpos de IgY foram eficazes na neutralização. Até a diluição de 1:100 da IgY, o anticorpo neutralizou a infecção das células pelo vírus. A replicação viral começou a ocorrer na diluição de 1:1.000 da IgY, como demonstrado na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Teste de neutralização do HAV com IgY anti-HAV e número de cópias do HAV detectadas na replicação.

	Controle (sem IgY)	Diluição da IgY				
		1:1	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Cópias RNA/mL	5,8 x 10 ⁵	ND	ND	ND	2,26	65,48
Neutralização	-----	Sim	Sim	Sim	Não	Não

ND = Não detectado

4.2.5. Eletroforese e “Western Blotting”

O padrão eletroforético das proteínas purificadas da gema do ovo que foram corridas no gel de poliacrilamida está de acordo com o padrão da IgY (Figura 4.1), onde o peso molecular da cadeia leve é 21kDa e a cadeia pesada de 70kDa (Hatta *et al.*, 1993). Em todos os grupos podemos observar as bandas mais espessas das cadeias da IgY, ou seja, em maior quantidade que as demais proteínas.

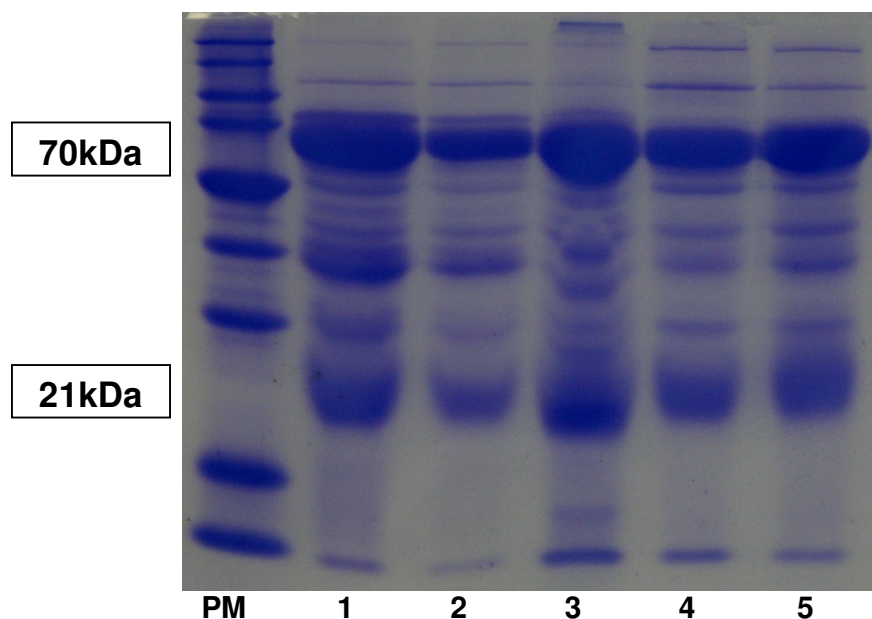


Figura 4.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da IgY. 1: Grupo I; 2: Grupo II; 3: Grupo III; 4: Grupo IV; 5: Grupo V; **PM**: Peso molecular.

O “Western Blotting” do vírus da hepatite A (HAF-203) não revelou nenhuma proteína quando incubado com a IgY do grupo II. No entanto, quando incubado com a IgY dos grupos III e IV, muitas proteínas do vírus foram reveladas, porém, quase todas as proteínas estavam juntas, não podendo ser diferenciadas pelo perfil de peso molecular. O grupo I apresentou somente uma banda com o mesmo perfil dos grupos III e IV, porém, com revelação muito fraca. No grupo V, nenhuma proteína viral foi revelada. Esses resultados podem ser observados na figura 4.2.

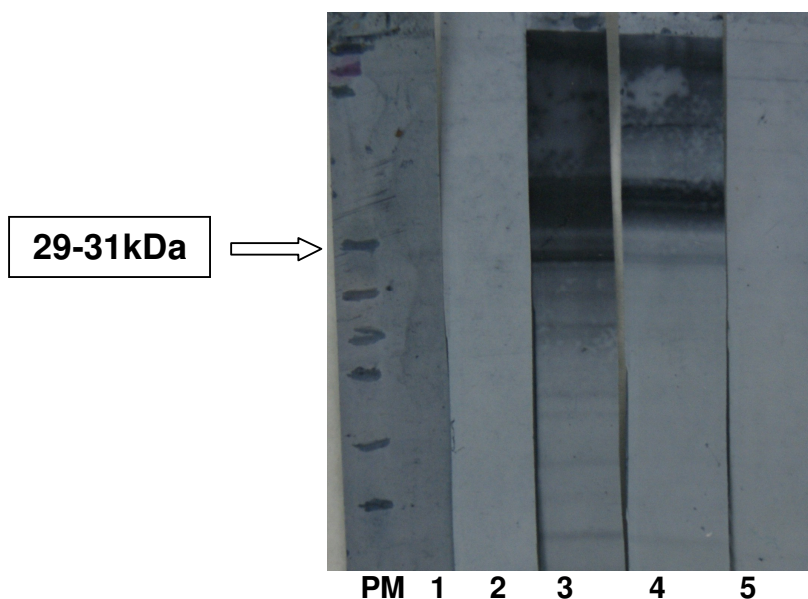


Figura 4.2 – “Western Blotting” da IgY. **PM:** Peso molecular; **1:** Grupo I; **2:** Grupo II; **3:** Grupo III; **4:** Grupo IV; **5:** Grupo V (controle negativo). Observam-se bandas específicas para o vírus da hepatite A apenas nas colunas referentes aos grupos III e IV. Na coluna referente ao grupo I também há uma banda, porém bem fraca (29-31kDa).

4.3. Detecção do HAV em tecido de fígado

A detecção do HAV em tecido de fígado através da imunofluorescência indireta foi realizada sob várias diluições tanto do anticorpo primário como do anticorpo secundário.

4.3.1. Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando IgY do grupo III

Nos experimentos demonstrados nesta seção, a IgY anti-HAV específica utilizada foi purificada do grupo III (HAV + IFA + CpG-ODN) e a IgY inespecífica utilizada como controle foi purificada do grupo V (IFA - controle). Nas tabelas a seguir podemos observar o resultado de diferentes combinações de diluições do anticorpo primário (IgY) e do anticorpo secundário (anti-IgY) (Tabelas 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6). As figuras após cada tabela exemplificam cada experimento (Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6).

Na primeira imunofluorescência, testamos diluições do anticorpo primário de 1:50, 1:75, 1:100 e 1:300 em duas amostras, uma de primata não-humano infectado com o HAV e uma de humano não infectado (Tabela 4.3 e Figura 4.3).

Tabela 4.3 – Diluições do anticorpo primário de 1:50 a 1:300 e do secundário de 1:700.

Tecido hepático	Diluições do anticorpo 1º									
	C (1:50)		1:50		1:75		1:100		1:300	
	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG
Cynomolgus infectado	- ^{*A}	+++	+	++	++	+++	++	++	+++	+ ^{*B}
Humano não-infectado	- ^{*C}	+++	+	++	++ ^{*D}	+++	++	++	NR	

C = IgY controle; **MT** = Marcação no tecido; **BG** = *Background*; **NR** = Não realizado;

Intensidade de reação: - = Sem reação; + = Fraco; ++ = Moderado; +++ = Forte.

* = Amostra referente à letra da prancha

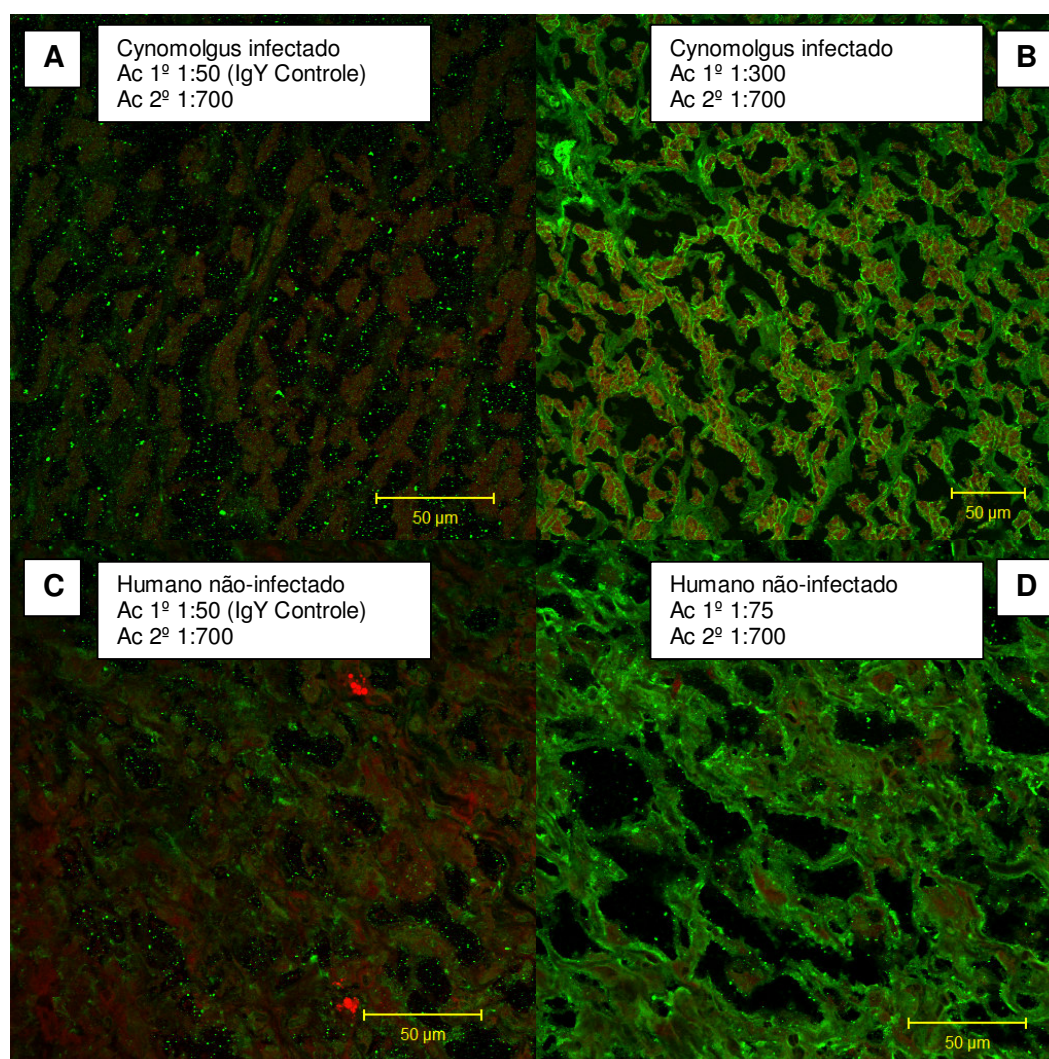


Figura 4.3 – Imunofluorescência indireta 1. Ac 1º = anticorpo primário; Ac 2º = anticorpo secundário.

Neste próximo experimento, testamos diluições do anticorpo secundário em 1:800 e 1:900 em três amostras diferentes, uma de primata não-humano infectado, uma de humano infectado e uma de humano não infectado (Tabela 4.4 e Figura 4.4).

Tabela 4.4 – Diluição do anticorpo primário de 1:200 e diluições do anticorpo secundário de 1:800 e 1:900.

Tecido hepático	Diluições do anticorpo 2º					
	C (1:800)		1:800		1:900	
	MT	BG	MT	BG	MT	BG
Cynomolgus infectado	- ^{*A}	++	+	+	+++	+ ^{*B}
Humano infectado	- ^{*C}	++	+	++	++	+ ^{*D}
Humano não-infectado	- ^{*E}	++	+++	+ ^{*F}	+	+

C = IgY controle; **MT** = Marcação no tecido; **BG** = *Background*;

Intensidade de reação: - = Sem reação; + = Fraco; ++ = Moderado; +++ = Forte.

* = Amostra referente à letra da prancha

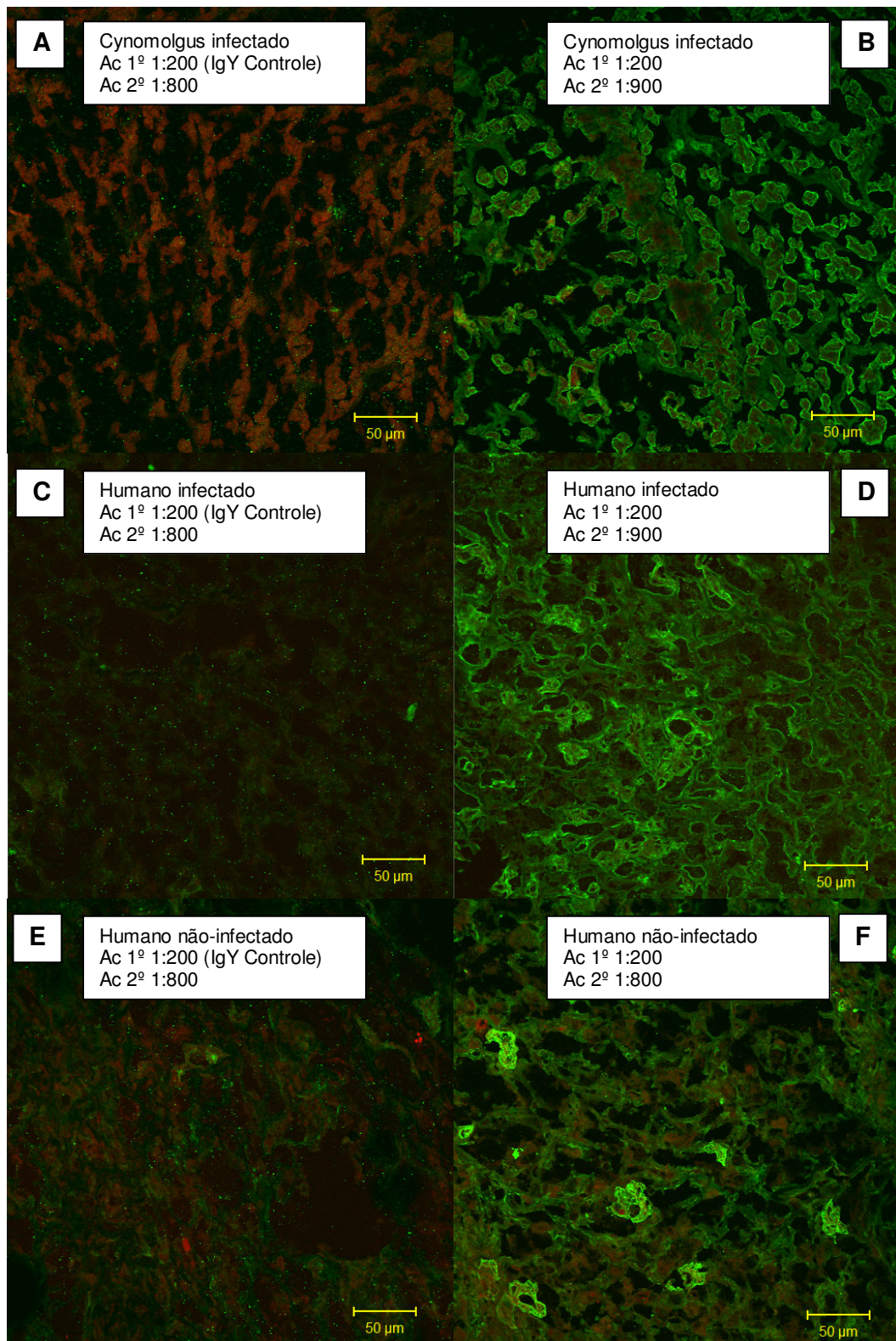


Figura 4.4 – Imunofluorescência indireta 2. Ac 1º = anticorpo primário; Ac 2º = anticorpo secundário.

Nesta imunofluorescência indireta, testamos diluições do anticorpo secundário de 1:1.000, 1:1.100, 1:1.200, 1:1.300, 1:1.400, 1:1.600, 1:1.800 e 1:2.000 somente em um tecido de primata não-humano infectado, onde a diluição de 1:1.200 foi a melhor (Tabela 4.5 e Figura 4.5).

Tabela 4.5 – Diluição do primário de 1:200 e diluições do anticorpo secundário de 1:1.000 a 1:2.000.

Tecido hepático	Diluições do anticorpo 2º									
	C (1:1.000)		1:1.000		1:1.200		1:1.400		1:2.000	
	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG
Cynomolgus infectado	- *A	++	+++	++	+++	+	+	+	+ *B	+

C = IgY controle; **MT** = Marcação no tecido; **BG** = *Background*;

Intensidade de reação: - = Sem reação; + = Fraco; ++ = Moderado; +++ = Forte.

* = Amostra referente à letra da prancha

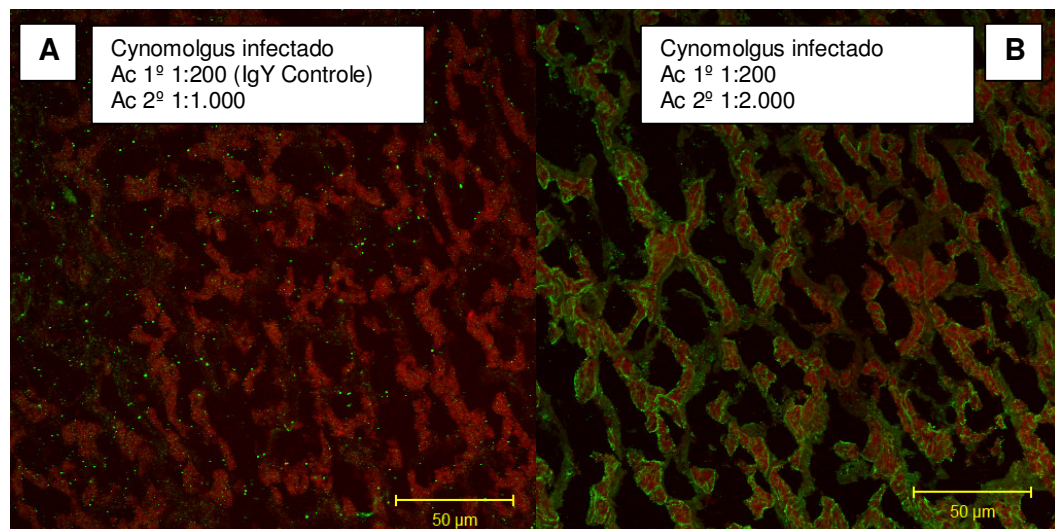


Figura 4.5 – Imunofluorescência indireta 3. Ac 1º = anticorpo primário; Ac 2º = anticorpo secundário.

Nesta imunofluorescência, testamos diluições do anticorpo primário de 1:200, 1:300, 1:500, 1:600, 1:1.000, 1:2.000, e 1:5.000 em quatro amostras, duas de primatas não-humanos, uma infectada e uma não infectada, e duas amostras de humanos, uma infectada e uma não infectada (Tabela 4.6 e Figura 4.6).

Tabela 4.6 – Diluição do primário de 1:200 a 1:5.000 e diluição do anticorpo secundário de 1:1.200.

Tecido hepático	Diluições do anticorpo 1º											
	C (1:300)		1:500		1:600		1:1.000		1:2.000		1:5.000	
	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG
Cynomolgus infectado	- *A	+++	+++	++	++ *B	++	++	+	+	-	-	-
Cynomolgus não-infectado	-	-	++	+	++	+	++	-	-	+	-	-
Humano infectado	- *C	++	+++	++	+++	*D ++	+	+	+	-	-	-
Humano não-infectado	- *E	+++	- *F	+	-	+	++	-	++	-	-	-

C = IgY controle; **MT** = Marcação no tecido; **BG** = *Background*;

Intensidade de reação: - = Sem reação; + = Fraco; ++ = Moderado; +++ = Forte.

* = Amostra referente à letra da prancha

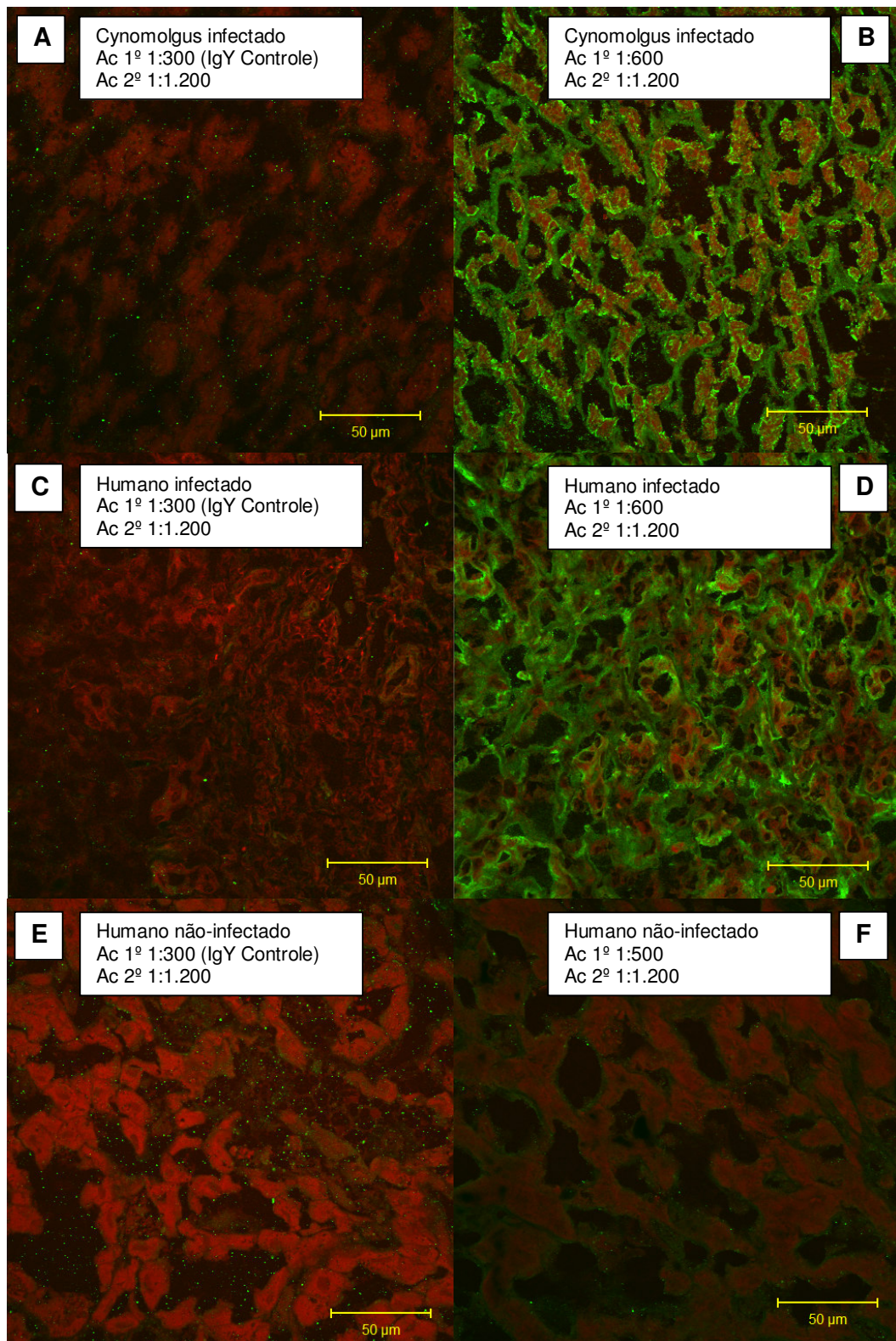


Figura 4.6 – Imunofluorescência indireta 4. Ac 1º = anticorpo primário; Ac 2º = anticorpo secundário.

Nos experimentos em que utilizamos a IgY proveniente do grupo III, independente da diluição, os cortes ficaram extremamente marcados, indicando que havia muitas ligações inespecíficas no tecido hepático.

4.3.2. Ensaios de imunofluorescência indireta utilizando IgY do grupo I

Nestes ensaios, a IgY anti-HAV específica utilizada foi purificada do grupo I (vacina + CpG-ODN) e a IgY inespecífica utilizada como controles foi purificada do grupo V (IFA – controle). Na tabela 4.7 podemos observar o resultado de diferentes combinações de diluições do anticorpo primário com diluição do anticorpo secundário de 1:1.200. A figura 4.7 exemplifica algumas marcações do experimento.

Tabela 4.7 – Diluição do anticorpo primário de 1:25 a 1:300 e diluição do anticorpo secundário de 1:1.200.

Tecido hepático	Diluições do anticorpo 1º											
	C (1:100)		1:25		1:50		1:100		1:200		1:300	
	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG	MT	BG
Cynomolgus infectado	- ^{*A}	+++	- ^{*B}	+++	++	+++	-	+++	-	++	-	++
Cynomolgus não-infectado	- ^{*C}	+++	++	+++	++	+++	- ^{*D}	+++	-	+++	+	+
Humano infectado	- ^{*E}	+++	NR		NR		- ^{*F}	+++	-	-	NR	
Humano não-infectado	-	+++	NR		NR		-	+++	-	+++	NR	

C = IgY controle; **MT** = Marcação no tecido; **BG** = *Background*; **NR** = Não realizado;

Intensidade de reação: - = Sem reação; + = Fraco; ++ = Moderado; +++ = Forte.

* = Amostra referente à letra da prancha

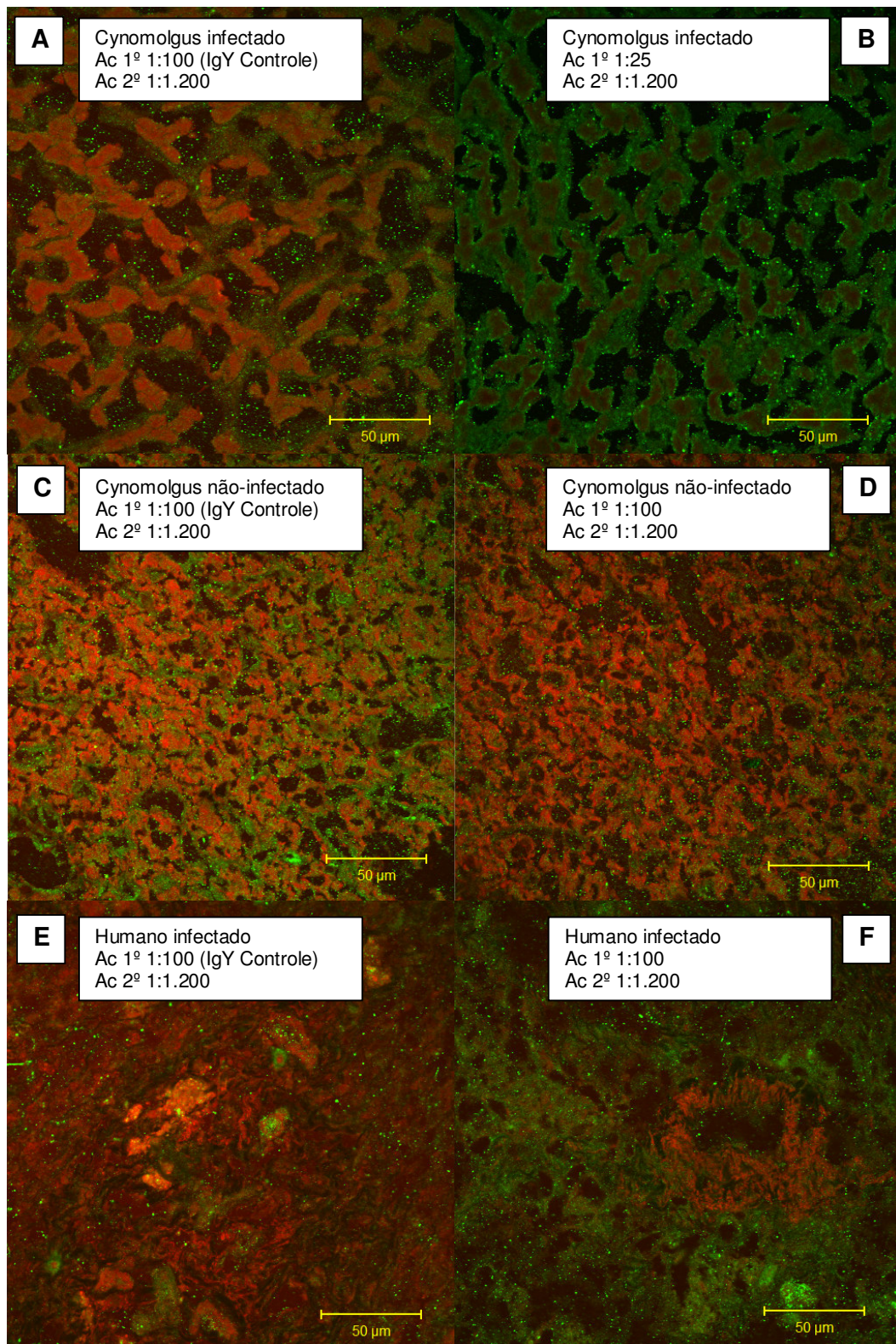


Figura 4.7 – Imunofluorescência indireta 5. Ac 1º = anticorpo primário; Ac 2º = anticorpo secundário.

5. DISCUSSÃO

A produção de anticorpos contra o vírus da hepatite A tem importante papel no diagnóstico e no tratamento; frequentemente essas funções exigem grandes quantidades de anticorpos. As imunoglobulinas anti-HAV usadas em testes de diagnóstico são principalmente anticorpos policlonais derivados de plasma humano ou de coelhos, que têm oferta limitada e podem causar possíveis riscos à saúde devido a impurezas e a reações cruzadas indesejáveis. A produção limitada da IgG pelo pequeno rendimento torna a produção do anticorpo muito dispendiosa. Neste trabalho consideramos os benefícios teóricos descritos na literatura relacionados à tecnologia da IgY para a produção de anticorpos policlonais e sua aplicação na pesquisa biomédica e no diagnóstico. Espera-se no futuro que a tecnologia da IgY desempenhe uma importância maior na pesquisa, diagnóstico e na imunoterapia (Tini *et al.*, 2002).

A produção de anticorpos anti-HAV nas aves representa um método ético para substituir a produção desses anticorpos em mamíferos. Neste estudo, o início da postura dos ovos ocorreu na décima oitava semana de idade das aves, sem alterações clínicas detectáveis, mesmo na curva de crescimento normal das aves submetidas à imunização (Tabela 4.1). Apenas áreas de degeneração gordurosa e de congestão hepática foram observadas. As lesões são consideradas inespecíficas e decorrentes da dieta comercial rica em gordura (Ayala *et al.*, 2009), pois um pré-requisito para o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcoólica é o acúmulo de excesso de triglicerídeos nos hepatócitos, e o acúmulo de lipídeos pode resultar em congestão hepática (Browning, 2009).

A primeira imunização ocorreu somente quando as aves atingiram vinte e um dias de idade para evitar a possibilidade de estresse com redução da produção de ovos (Lévesque *et al.*, 2007). A última imunização ocorreu aos noventa e oito dias de idade das aves, ou seja, vinte e quatro dias antes do início da postura dos ovos. Analisando a produção de anticorpos anti-HAV no soro das galinhas após cada imunização, podemos observar que as aves que foram imunizadas com HAV e adjuvante incompleto de Freund (grupos III e IV), com a presença ou não de CpG-ODN, exibiram resposta para o HAV já na primeira imunização. Deve-se ressaltar que a mensuração de anticorpos anti-HAV no soro foi realizada pelo ELISA anti-HAV

total, ou seja, identifica qualquer tipo de imunoglobulina, podendo ser nas aves IgY, IgM ou IgA. Após a segunda imunização, todos os grupos soro-converteram e continham altos títulos de anticorpos anti-HAV, exceto o grupo V, resultado esperado por se tratar do controle (Gráfico 4.1). Os grupos que foram imunizados com CpG-ODN (grupos I e III) apresentaram títulos mais altos de imunoglobulina específica anti-HAV dentre todos os grupos ao final de todas as imunizações, com destaque para o grupo III que apresentou título mais elevado que os demais grupos. Os grupos imunizados com a vacina (grupos I e II) alcançaram altos títulos noventa dias após a primeira imunização, o que confirma que a vacina comercial pode ser útil para produção de IgY anti-HAV. O uso do adjuvante incompleto de Freund não resultou no aumento significativo do título de anticorpos anti-HAV no sangue das aves comparado às aves sem este adjuvante ($p>0,05$). Porém, quando a IgY purificada da gema dos ovos foi quantificada, nós observamos que o grupo tratado com HAV, IFA e CpG-ODN (grupo III) apresentou aumento significativo dos títulos de IgY ($p<0,05$).

Embora o título de anticorpos tenha variado de acordo com a formulação do inóculo utilizado em cada grupo, a quantidade de anticorpos produzidos foi consistentemente alta, onde cada grupo colocou aproximadamente 281 ovos em quatro meses (dezesseis semanas). Considerando que a gema do ovo de galinha contém de 100 a 150 mg de anticorpos IgY, esta quantidade de ovos pode resultar em 28 a 42 g de IgY ao ano por galinha (Mine *et al.*, 2002; Pauly *et al.*, 2009). A fração de anticorpos IgY específicos representa de 2 a 10% da IgY total obtida (Schade *et al.*, 1994). A espectrofotometria do produto purificado das gemas foi realizada para observar a quantidade de proteínas totais na gema do ovo, no entanto, este método somente identifica a quantidade de proteínas purificadas e não a IgY especificamente. Por esse motivo, o grupo V (controle) também apresenta alta concentração de proteínas na espectrofotometria, uma vez que este método identifica todas as proteínas, inclusive a IgY, que no caso deste grupo está presente, mas é inespecífica. O grupo que apresentou maior concentração média de proteínas totais por semana na gema foi o grupo III (9,827mg/mL), mas os outros grupos também tiveram altas concentrações.

Neste estudo, os ovos coletados foram classificados por semana e grupo de imunização. Os métodos de titulação da IgY pelo ELISA e a neutralização em cultura de células são capazes de demonstrar a quantidade da IgY purificada da gema.

Como observado na titulação, em todos os grupos imunizados, o pico máximo de título de IgY anti-HAV aconteceu na nona semana de postura dos ovos (178 dias de vida das aves) e estabilizou até a décima sexta semana após o início da produção dos ovos (gráfico 4.4), resultado similar descrito por Loeken *et al.* (1983). Curiosamente, entre todos os grupos, somente as aves do grupo III apresentaram transferência de IgY anti-HAV para a gema na primeira semana de ovoposição (122 dias de idade). Esse fato sugere que o anticorpo IgY anti-HAV foi transferido lentamente do soro para a gema nas semanas seguintes.

O grupo de aves imunizadas com HAV, IFA e suplementada com CpG-ODN, teve aumento de mais de cem vezes no título de IgY anti-HAV em todas as semanas, quando comparado ao grupo de aves imunizadas com HAV e IFA (Gráfico 4.4), ou seja, a CpG-ODN pode ser utilizada como suplemento de adjuvante em imunizações. No grupo III, a concentração média de IgY anti-HAV foi sempre maior que dos outros grupos, da primeira à décima sexta semana de coleta dos ovos. A diferença foi significativa ($p < 0,05$). A obtenção de altos níveis de anticorpos específicos com a utilização de adjuvantes, já foi descrito anteriormente por Lévesque *et al.* (2007). O rendimento da IgY específica aumentou ao longo do tempo, de modo que o título de anticorpos permaneceu elevado, mesmo após bastante tempo decorrido das imunizações, além da capacidade demonstrada pela IgY de neutralização, onde bloqueou a atividade funcional do HAV *in vitro*. A neutralização ocorreu até a diluição de 1:100 da IgY. Na diluição de 1:1.000 a quantidade de HAV encontrado após a neutralização foi muito baixa (2,26 cópias RNA/mL), porém, deve-se considerar como uma diluição sem eficiência em neutralizar o HAV. Fu *et al.* (2006) encontraram resultado similar com a IgY anti-SARS coronavírus (Síndrome Respiratória Aguda Grave), no qual na diluição de 1:640 obtiveram neutralização, porém, na diluição de 1:1.280 o vírus replicou. Esses resultados demonstram que a IgY anti-HAV proveniente da gema do ovo pode ser útil em imunoterapia passiva contra hepatite A, uma vez que as imunoglobulinas parecem ser eficazes para profilaxia pré-exposição e tratamento pós-exposição ao vírus da hepatite A. (Liu *et al.*, 2009).

A caracterização e a especificidade da IgY para o vírus da hepatite A também foram confirmadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida e pelo “Western Blotting” em membrana de nitrocelulose. Na análise das proteínas na eletroforese através do perfil de peso molecular das cadeias leve e pesada, pode-se inferir que a

imunoglobulina presente no purificado da gema é a IgY, pois a cadeia leve da IgY pesa 21kDa e a cadeia pesada pesa 70kDa (Figura 4.1) (Hatta *et al.*, 1993), enquanto, o peso molecular das cadeias leve e pesada da IgG são 22kDa e 50kDa, respectivamente (Hatta *et al.*, 1993). Outras proteínas além da IgY podem ser observadas na eletroforese, porém, em quantidades bem inferiores, fato que é evidenciado pela densidade (espessura) das bandas. No “Western Blotting”, o interesse principal foi mostrar a especificidade da IgY ao HAV, portanto, o vírus foi desnaturado, corrido em gel de poliacrilamida e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose. Nos grupos III e IV observamos que houve ligação da IgY purificada às proteínas do vírus presentes na membrana, enquanto a IgY do grupo I apresentou somente uma banda bem fraca e a IgY do grupo II não se ligou, aparentemente não demonstrando especificidade ao vírus. O grupo V também não demonstrou ligação.

As detecções de anticorpos específicos no soro das aves e nas gemas purificadas em conjunto com a neutralização em cultura de célula demonstraram que as galinhas produziram anticorpos anti-HAV específicos e este foi transportado para a gema dos ovos. Além disso, a eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que este anticorpo purificado da gema é a IgY. Juntando todos esses dados, conseguimos comprovar que as aves produziram IgY anti-HAV e estes anticorpos foram transferidos para a gema.

Após comprovar que o anticorpo purificado era a IgY e específica para o HAV, começamos a utilizar esta imunoglobulina na detecção do vírus em tecido hepático. Para realizar a imunofluorescência indireta utilizamos IgY dos grupos I, III e V, os dois primeiros como anticorpo específico e o terceiro o anticorpo inespecífico (controle). Inicialmente, a IgY purificada da gema dos ovos escolhida como anticorpo primário para realização da imunofluorescência indireta foi a do grupo III, pois este grupo apresentou o melhor título de anticorpos IgY anti-HAV. O estudo também visa padronizar as diluições dos anticorpos primário e secundário, pois a IgY anti-HAV não havia sido descrita até o momento, portanto, vários testes com muitas diluições foram realizados. No primeiro experimento, as diluições do anticorpo primário testadas foram de 1:50 a 1:300 com o objetivo de determinar a diluição ideal do anticorpo primário. Porém, todos os cortes apresentaram bastante “background” com muito precipitado de fluorescência e bastante sujeira, inclusive em locais na lâmina que não havia tecido de fígado. Nos cortes que foram incubados com a IgY

específica (grupo III) dois tipos de problemas ocorreram, o primeiro foram os pontos verdes no vidro da lâmina e o outro foi a marcação inespecífica dos hepatócitos, pois mesmo no tecido de fígado controle (não-infectado) houve marcação do anticorpo. No caso dos cortes que foram incubados com o anticorpo controle (grupo V), houve somente o precipitado com pontos verdes no vidro da lâmina, neste caso, o resultado foi muito claro, os hepatócitos não ficaram marcados pela IgY (Tabela 4.3 e Figura 4.3).

A inespecificidade ficou bem evidenciada em todos os outros experimentos que foram realizados com o anticorpo IgY proveniente do grupo III (Tabela 4.4, Tabela 4.5, Tabela 4.6). Inclusive, na segunda imunofluorescência, o tecido hepático de humano de uma paciente de hepatite fulminante sem causa de etiologia viral (ausência de hepatite A), a IgY específica marcou células que aparentavam ser células de Kupffer (macrófagos) (Figura 4.4, prancha F). Esse resultado poderia ser interpretado de duas formas: o anticorpo está marcando tudo e não está sendo específico ou o paciente de hepatite fulminante não foi diagnosticado corretamente. Esta segunda situação seria um caso positivo para hepatite A, que não foi diagnosticado pela sorologia, pois em casos de hepatite fulminante, o soro do paciente é testado para detectar a presença de anticorpos para hepatite A, hepatite B e hepatite C.

Porém, conforme outros ensaios de imunofluorescências foram sendo feitos, observamos que independente do tecido hepático estar infectado ou não-infectado pelo vírus da hepatite A, o anticorpo marcava, mesmo que com fraca marcação. Somente os tecidos de fígado que eram incubados com anticorpo IgY inespecífico, proveniente do grupo V, não apresentavam marcação tecidual, somente pontos de precipitado no vidro da lâmina. A não marcação tecidual era um resultado esperado, pois as frangas desse grupo não receberam qualquer tipo de antígeno. Os cortes não-infectados com HAV (controle) incubados com IgY específica apresentaram menos marcação tecidual a partir da diluição 1:2.000 ou maior do anticorpo primário (Tabela 4.6), ou seja, uma diluição muito alta, onde mesmo que o tecido estivesse infectado o anticorpo específico não marcaria. Quando o anticorpo secundário foi diluído em 1:2.000, maior diluição recomendada pelo fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), também houve menor marcação inespecífica do anticorpo (Tabela 4.5). No entanto, os melhores resultados foram observados com diluição do anticorpo secundário em 1:1.200, portanto, estabelecemos esta diluição como ideal

e todos os experimentos após esta observação foram feitos com o anticorpo secundário em 1:1.200.

A utilização da IgY proveniente do grupo imunizado com HAV, IFA e CpG-ODN (grupo III) na imunofluorescência não gerou bons resultados; o anticorpo não marcou especificamente. Os tecidos hepáticos infectados e não infectados foram marcados pelo anticorpo com intensidade similar. A escolha da IgY do grupo III foi feita pela concentração deste anticorpo mais alta que nos demais grupos. Porém, no momento da escolha do anticorpo, um fator muito importante, provável motivo da marcação inespecífica não foi pensado. O grupo III foi imunizado com o vírus da hepatite A, adjuvante incompleto de Freund e CpG-ODN como dito anteriormente, e este vírus foi produzido em cultura de células FRhK-4, células de rim de macacos rhesus. Na produção do HAV, as células são rompidas em vários ciclos de congelamento e descongelamento para a captura do vírus, com isso, restos celulares acabam sendo capturados também. Portanto, quando as galinhas dos grupos III e IV foram imunizadas, elas foram imunizadas com proteínas de primatas não-humanos também, presentes nos restos celulares. Como as aves são filogeneticamente distantes dos macacos, as proteínas conservadas de mamíferos exibem alta imunogenicidade nas aves (Gassmann *et al.*, 1990), portanto, as proteínas celulares foram reconhecidas pelo sistema imune das aves como antígeno não-próprio, com isso, foi produzido anticorpos IgY contra essas proteínas celulares de primatas não-humanos.

O purificado da gema do ovo desses grupos contém IgY específica de proteínas de primatas não-humanos, então, quando utilizada na imunofluorescência indireta, a IgY marcará proteínas conservadas que estão presentes nos hepatócitos tanto de primatas não-humanos como de primatas humanos. Huang *et al.* (2008), descreveram que anticorpos IgY produzidos contra proteínas conservadas de humanos também reconhecem proteínas ortólogas de outras espécies de mamíferos tais como primatas não-humanos, rato, camundongo, porco, cabra, vaca e cão. Tal fato também pode ser comprovado no “Western Blotting”, pois o vírus que foi corrido em eletroforese e transferido para a membrana de nitrocelulose, também continha restos celulares, e os únicos grupos que apresentaram ligação específica muito expressiva foram os grupos III e IV, que foram imunizados com o vírus cultivado em cultura de células.

Uma vez que nós não estávamos obtendo bons resultados com a IgY anti-HAV proveniente do grupo III, partimos para o teste com o anticorpo proveniente do grupo I, pois dentre os dois grupos imunizados com a vacina, o grupo I apresentou títulos mais elevados de IgY anti-HAV. Como a diluição do anticorpo secundário foi mantida em 1:1.200 em todos os experimentos, em uma única tabela podemos demonstrar os resultados da comparação de várias diluições do anticorpo IgY anti-HAV, de 1:25 a 1:300 (Tabela 4.7). Os resultados com este anticorpo foram mais promissores, pois em diluições mais baixas como 1:100 e 1:200 não houve intensa marcação inespecífica do tecido, no entanto, os cortes de fígado que eram sabidamente infectados com o vírus da hepatite A não apresentaram ligação específica pelo anticorpo, sendo necessários mais experimentos para chegar à diluição ideal do anticorpo primário.

Apesar da melhoria dos resultados com o anticorpo do grupo I, o acúmulo de pontos de precipitado verde no vidro da lâmina continuou bem intenso. Uma explicação plausível para o precipitado é presença de resquícios de PEG na solução do anticorpo IgY anti-HAV, pois o método de precipitação pelo polietileno glicol foi o utilizado para purificação da IgY, e o PEG não é totalmente retirado da solução final do anticorpo. Segundo Ismail (2005), a precipitação pelo PEG é relativamente específica às imunoglobulinas e aos complexos de imunoglobulinas. Portanto, o PEG presente na solução do anticorpo purificado pode formar complexos de IgY que se depositam no corte de fígado e no vidro da lâmina, com posterior ligação do anticorpo secundário fluorescente aos complexos. Como descrito por Ellis *et al.* (2005), uma das limitações do método de precipitação por PEG é que pode interferir em alguns imunoensaios.

Neste estudo, tentamos aumentar a resposta imune para produção de anticorpos específicos para o vírus da hepatite A através da co-administração de IFA com oligodesoxinucleotídeo sintético (CpG-ODN). CpG-ODN são agonistas sintéticos de receptores “Toll-like” 9 e indutores potentes da imunidade inata e adquirida (Vincent *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que CpG-ODN pode funcionar como adjuvante eficaz para vacinas contra uma variedade de patógenos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas (Davis *et al.*, 1998; Moldoveanu *et al.*, 1998; Eastcott *et al.*, 2001; Mahmood *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). No caso da hepatite A, a CpG-ODN tem sido benéfica para aumentar a imunogenicidade tanto na vacina comercial inativada quanto para o HAV, como demonstrado nos gráficos

4.1 e 4.4. A adição de CpG-ODN aumentou significativamente a IgY anti-HAV. No que diz respeito à regulamentação de proteção aos animais, a imunização de aves oferece vantagens: a imunização com CpG-ODN como adjuvante foi bem tolerada e a coleta dos ovos, em contraste a sangria de animais, é não-invasiva (Gassmann *et al.*, 1990). O processo de isolamento é simples e econômico, tendo produção com grande rendimento e em larga escala, fatos que comprovam o uso de aves como uma alternativa ética para produção de anticorpos específicos anti-HAV.

A imunofluorescência utilizando IgY específica para outros patógenos já foi descrita (Staak, 1996; Shin *et al.*, 2009), porém, na literatura científica, não há relato sobre a produção de IgY específica para o vírus da hepatite A e utilização em terapia ou em alguma técnica de diagnóstico. Portanto, esse estudo é o pioneiro na produção de IgY anti-HAV. A padronização da detecção do HAV através da técnica de imunofluorescência indireta em tecido de fígado utilizando IgY anti-HAV, não foi alcançada, porém, os resultados são mais promissores em relação ao anticorpo produzido pelas aves imunizadas com vacina mais CpG-ODN. A possibilidade deste anticorpo IgY anti-HAV ser mais rentável que os anticorpos anti-HAV disponíveis no mercado é muito grande, pois em um estudo descrito por Amado *et al.* (2010), o anticorpo norte-americano (United States Biological, Swampscott, MA, USA) utilizado na imunofluorescência indireta para detecção de HAV no fígado e em outros tecidos, a diluição utilizada foi de 1:20. Essa diluição utilizada retrata a baixa rentabilidade e o quão caro é trabalhar com os anticorpos disponíveis no mercado. Para a melhora dos resultados da IgY na imunofluorescência, talvez seja necessário a escolha de outro método de purificação que possa refinar o produto purificado. Como comprovado pela eletroforese, o purificado da gema possui outras proteínas além da IgY. Entre essas proteínas, algumas podem causar algum tipo de interferência na ligação do anticorpo com o vírus presente no corte de fígado. A precipitação pelo PEG é uma técnica bruta e não-específica, que separa as proteínas pela solubilidade (Atha *et al.*, 1981).

Além da utilização em métodos de diagnóstico e pesquisa, a administração oral de IgY purificada pode ser usada em imunoterapia passiva contra infecções no trato gastrointestinal por bactérias e vírus. Deste modo, a IgY é uma alternativa a antibióticos para tratamento de patógenos entéricos antibiótico-resistentes em humanos e animais (Carlander *et al.*, 2000). O tratamento oral com IgY pode ser realizado, pois a gema de ovo purificada possui algumas proteínas além da IgY

(Nilsson *et al.*, 2007) e uma dessas proteínas, a ovomucóide da galinha, presente no purificado da gema do ovo, protege até certo ponto contra a degradação proteolítica da IgY pelas enzimas digestivas. Portanto, protege a IgY quando administrada em tratamento oral para infecções gastrointestinais (Shah *et al.*, 2004; Kovacs-Nolan *et al.*, 2005b). Fu *et al.* (2006) demonstraram que produtos manufaturados para fins comerciais tais como cápsulas, *spray* e solução intravenosa podem ser fabricados a partir de IgY, para isso, é necessário que determine-se novos métodos de refinamento da purificação da IgY proveniente de gema de ovo. Para facilitar o processo de produção em larga escala de IgY purificada, as técnicas de desengorduramento e purificação são pontos-chave para futuros estudos (Fu *et al.*, 2006).

6. CONCLUSÕES

- ✓ A produção de IgY específica para o vírus da hepatite A através de imunizações de frangas poedeiras é um procedimento exeqüível, relativamente simples e adequado à produção em larga escala.
- ✓ A associação dos adjuvantes CpG-ODN e adjuvante incompleto de Freund contribuiu para aumentar o rendimento na produção de IgY anti-HAV.
- ✓ A técnica de imunofluorescência indireta para detecção do antígeno HAV no fígado com utilização da IgY ainda necessita ser ajustada para diminuir o excesso de ligações inespecíficas encontradas.
- ✓ Em conjunto, os dados desta dissertação demonstraram que frangas poedeiras são eficientes produtoras de anticorpos específicos que podem ser utilizados na saúde pública.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Akerstrom, B.; Brodin, T.; Reis, K.; Björck, L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.*, **1985**; 135(4): 2589-2592.
- ✓ Akita, E.; Nakai, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.*, **1992**; 57(3): 629-634.
- ✓ 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.*, **1993**; 160(2): 207-214.
- ✓ Akriviadis, E.A.; Redeker, A.G. Fulminant hepatitis A in intravenous drug users with chronic liver disease. *Ann. Intern. Med.*, **1989**; 110(10): 838-839.
- ✓ Al-Natour, M.Q.; Ward, L.A.; Saif, Y.M.; Stewart-Brown, B.; Keck, L.D. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **2004**; 48(1): 177-182.
- ✓ Amado, L.A.; Villar, L.M.; de Paula, V.S.; Gaspar, A.M. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J. Virol. Methods*, **2008**; 148(1-2): 74-80.
- ✓ Amado, L.A.; Marchevsky, R.S.; de Paula, V.S.; Hooper, C.; Freire, M.S.; Gaspar, A.M.; Pinto, M.A. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. *Int. J. Exp. Pathol.*, **2010**; 91(1): 87-97.
- ✓ Amon, J.J.; Devasia, R.; Xia, G.; Nainan, O.V.; Hall, S.; Lawson, B.; Wolthuis, J.S.; Macdonald, P.D.; Shepard, C.W.; Williams, I.T.; Armstrong, G.L.; Gabel, J.A.; Erwin, P.; Sheeler, L.; Kuhnert, W.; Patel, P.; Vaughan, G.; Weltman, A.; Craig, A.S.; Bell, B.P.; Fiore, A. Molecular epidemiology of foodborne hepatitis A outbreaks in the United States, 2003. *J. Infect. Dis.*, **2005**; 192(8): 1323-1330.
- ✓ Angarano, G.; Trotta, F.; Monno, L.; Santantonio, T.; Pastore, G. Serum IgA anti-hepatitis A virus as detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Diagnostic significance in patients with acute and protracted hepatitis A. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **1985**; 3(6): 521-523.
- ✓ Armstrong, G.L.; Bell, B.P. Hepatitis A virus infections in the United States: model-based estimates and implications for childhood immunization. *Pediatrics*, **2002**; 109(5): 839-845.
- ✓ Arora, N.K.; Nanda, S.K.; Gulati, S.; Ansari, I.H.; Chawla, M.K.; Gupta, S.D.; Panda, S.K. Acute viral hepatitis types E, A, and B singly and in combination in acute liver failure in children in north India. *J. Med. Virol.*, **1996**; 48(3): 215-221.

- ✓ Asher, L.V.; Binn, L.N.; Mensing, T.L.; Marchwicki, R.H.; Vassell, R.A.; Young, G.D. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.*, **1995**; 47(3): 260-268.
- ✓ Atha, D.H.; Ingham, K.C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.*, **1981**; 256(23): 12108-12117.
- ✓ Ayala, I.; Castillo, A.M.; Adanez, G.; Fernandez-Rufete, A.; Perez, B.G.; Castells, M.T. Hyperlipidemic chicken as a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **2009**; 234(1): 10-16.
- ✓ Bade, H.; Stegemann, H. Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *J. Immunol. Methods*, **1984**; 72(2): 421-426.
- ✓ Baroudy, B.M.; Ticehurst, J.R.; Miele, T.A.; Maizel, J.V.Jr.; Purcell, R.H.; Feinstone, S.M. Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1985**; 82(7): 2143-2147.
- ✓ Bell, B.P.; Shapiro, C.N.; Alter, M.J.; Moyer, L.A.; Judson, F.N.; Mottram, K.; Fleenor, M.; Ryder, P.L.; Margolis, H.S. The diverse patterns of hepatitis A epidemiology in the United States-implications for vaccination strategies. *J. Infect. Dis.*, **1998**; 178(6): 1579-1584.
- ✓ Bell, B.P. Global epidemiology of hepatitis A: implications for control strategies. In: Margolis, H.S.; Alter, M.J.; Liang, J.T.; Dienstag, J.L. (ed.). *Viral hepatitis and liver disease*. London (United Kingdom): International Medical Press; **2002**. p. 9-14
- ✓ Bernardi, G.; Cook, W.H. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. *Biochim. Biophys. Acta*, **1960**; 44: 86-96.
- ✓ Bialek, S.R.; Thoroughman, D.A.; Hu, D.; Simard, E.P.; Chattin, J.; Cheek, J.; Bell, B.P. Hepatitis A incidence and hepatitis a vaccination among American Indians and Alaska Natives, 1990-2001. *Am. J. Public Health*, **2004**; 94(6): 996-1001.
- ✓ Bloch, A.B.; Stramer, S.L.; Smith, J.D.; Margolis, H.S.; Fields, H.A.; McKinley, T.W.; Gerba, C.P.; Maynard, J.E.; Sikes, R.K. Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. *Am. J. Public Health*, **1990**; 80(4): 428-430.
- ✓ Boscato, L.M.; Stuart, M.C. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin. Chem.*, **1988**; 34(1): 27-33.
- ✓ Bosch, A.; Sánchez, G.; Le Guyader, F.; Vanaclocha, H.; Haugarreau, L.; Pinto, R.M. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.*, **2001**; 43(12): 61-65.
- ✓ Bower, W.A.; Nainan, O.V.; Han, X.; Margolis, H.S. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.*, **2000**; 182(1): 12-17.
- ✓ Browning, J.D. New imaging techniques for non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.*, **2009**; 13(4): 607-619.

- ✓ Bruisten, S.M.; van Steenberghe, J.E.; Pijl, A.S.; Niesters, H.G.; van Doornum, G.J.; Coutinho, R.A. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J. Med. Virol.*, **2001**; 63(2): 88-95.
- ✓ Burley, R.W.; Cook, W.H. Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituent alpha- and beta-lipovitellins. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1961**; 39: 1295-1307.
- ✓ Buti, M.; Jardí, R.; Bosch, A.; Rodríguez, F.; Sánchez, G.; Pinto, R.; Costa, X.; Sánchez-Avila, J.F.; Cotrina, M.; Esteban, R.; Guardia, J. Assessment of the PCR-Southern blot technique for the analysis of viremia in patients with acute hepatitis A. *Gastroenterol. Hepatol.*, **2001**; 24(1): 1-4.
- ✓ Calzado, E.G., Garrido, R.M.G.; Schade, R. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens. *Altern. Lab. Anim.*, **2001**; 29(6): 717-726.
- ✓ Camenisch, G.; Tini, M.; Chilov, D.; Kvietikova, I.; Srinivas, V.; Caro, J.; Spielmann, P.; Wenger, R.H.; Gassmann, M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB J.*, **1999**; 13(1): 81-88.
- ✓ Cameron, J.D.S. Infective hepatitis. *Q. J. Med.*, **1943**; 12: 139–155.
- ✓ Cario, E.; Rosenberg, I.M.; Brandwein, S.L.; Beck, P.L.; Reinecker, H.C.; Podolsky, D.K. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J. Immunol.*, **2000**; 164(2): 966-972.
- ✓ Carlander, D.; Kollberg, H.; Wejaker, P.E.; Larsson, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.*, **2000**; 21(1): 1-6.
- ✓ Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **1999**; 48(RR-12):1–37.
- ✓ Centers for Disease Control and Prevention. Final 2003 reports of notifiable diseases. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **2004**; 53: 687–705.
- ✓ Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **2006**; 55(RR07): 1–23.
- ✓ Chalghoumi, R.; Théwis, A.; Portetelle, D.; Beckers, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. *Poult. Sci.*, **2008**; 87(1): 32-40.
- ✓ Chalghoumi, R.; Théwis, A.; Beckers, Y.; Marcq, C.; Portetelle, D.; Schneider, Y.J. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in vitro. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2009a**; 6(5): 593-604.

- ✓ Chalghoumi, R.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Théwis, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2009b**; 13(2): 295-308.
- ✓ Chang, H.M.; Ou-Yang, R.F.; Chen, Y.T.; Chen, C.C. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J. Agric. Food Chem.*, **1999**; 47(1): 61-66.
- ✓ Chang, H.M.; Lee, Y.C.; Chen, C.C.; Tu, Y.Y. Microencapsulation protects immunoglobulin in yolk (IgY) specific against *Helicobacter pylori* urease. *J. Food Sci.*, **2002**; 67(1): 15-20.
- ✓ Ching, K.Z.; Nakano, T.; Chapman, L.E.; Demby, A.; Robertson, B.H. Genetic characterization of wild-type genotype VII hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.*, **2002**; 83(Pt 1): 53-60.
- ✓ Chiriaco, P.; Guadalupi, C.; Armigliato, M.; Bortolotti, F.; Realdi, G. Polyphasic course of hepatitis type A in children. *J. Infect. Dis.*, **1986**; 153(2): 378-379.
- ✓ Cho, Y.H.; Lee, J.J.; Park, I.B.; Huh, C.S.; Baek, Y.J.; Park, J. Protective effect of microencapsulation consisting of multiple emulsification and heat gelation processes on immunoglobulin in yolk. *J. Food Sci.*, **2005**; 70(2): 149-151.
- ✓ Ciocca, M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine*, **2000**; 18 Suppl 1: S71-S74.
- ✓ Ciocca, M.; Moreira-Silva, S.F.; Alegria, S.; Galoppo, M.C.; Ruttiman, R.; Porta, G.; Da Silvera, T.R.; Rubio, P.; Macias, M.; Cervantes, Y.; Avila-Aguero, M.L.; Clemens, S.A.; Clemens, R.; Weil, J. Hepatitis A as an etiologic agent of acute liver failure in Latin America. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **2007**; 26(8): 711-715.
- ✓ Cockayne, E.A. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q. J. Med.*, **1912**; 6:1-29.
- ✓ Cohen, J.I.; Rosenblum, B.; Ticehurst, J.R.; Daemer, R.J.; Feinstone, S.M.; Purcell, R.H. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987a**; 84(8): 2497-2501.
- ✓ Cohen, J.I.; Ticehurst, J.R.; Purcell, R.H.; Buckler-White, A.; Baroudy, B.M. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J. Virol.*, **1987b**; 61(1): 50-59.
- ✓ Cohen, J.I.; Feinstone, S.; Purcell, R.H. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J. Infect. Dis.*, **1989**; 160(5): 887-890.
- ✓ Conn, P.M. Sourcebook of Models for Biomedical Research. Totowa, New Jersey (USA): Humana Press; **2008**.
- ✓ Cooper, C.L.; Davis, H.L.; Morris, M.L.; Efler, S.M.; Adhami, M.A.; Krieg, A.M.; Cameron, D.W.; Heathcote, J. CpG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist

oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J. Clin. Immunol.*, **2004**; 24(6): 693-701.

- ✓ Costa-Mattioli, M.; Monpoeho, S.; Nicand, E.; Aleman, M.H.; Billaudel, S.; Ferré, V. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hepat.*, **2002a**; 9(2): 101-106
- ✓ Costa-Mattioli, M.; Cristina, J.; Romero, H.; Perez-Bercof, R.; Casane, D.; Colina, R.; Garcia, L.; Vega, I.; Glikman, G.; Romanowsky, V.; Castello, A.; Nicand, E.; Gassin, M.; Billaudel, S.; Ferré, V. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.*, **2002b**; 76(18): 9516-9525.
- ✓ Cuthbert, J.A. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2001**; 14(1): 38-58.
- ✓ Daemer, R.J.; Feinstone, S.M.; Gust, I.D.; Purcell, R.H. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect. Immun.*, **1981**; 32(1): 388-393.
- ✓ Dagan, R.; Leventhal, A.; Anis, E.; Slater, P.; Ashur, Y.; Shouval, D. Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA*, **2005**; 294(2): 202-210.
- ✓ Dalpke, A.H.; Zimmermann, S.; Albrecht, I.; Heeg, K. Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*, **2002**; 106(1): 102-112.
- ✓ Davalos-Pantoja, L.; Ortega-Vinuesa, J.L.; Bastos-González, D.; Hidalgo-Alvarez, R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2000**; 11(6): 657-673.
- ✓ Davis, H.L.; Weeratna, R.; Waldschmidt, T.J.; Tygrett, L.; Schorr, J.; Krieg, A.M. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.*, **1998**; 160(2): 870-876.
- ✓ Dawber, T.R.; Nickerson, R.J.; Brand, F.N.; Pool, J. Eggs, serum cholesterol, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1982**; 36(4): 617-625.
- ✓ de Paula, V.S.; Perse, A.S.; Amado, L.A.; de Moraes, L.M.; de Lima, S.M.; Tourinho, R.S.; Gaspar, A.M.; Pinto, M.A. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2009**; 28(10): 1167-1176.
- ✓ De Serres, G.; Cromeans, T.L.; Levesque, B.; Brassard, N.; Barthe, C.; Dionne, M.; Prud'homme, H.; Paradis, D.; Shapiro, C.N.; Nainan, O.V.; Margolis, H.S. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J. Infect. Dis.*, **1999**; 179(1): 37-43.
- ✓ Debray, D.; Cullufi, P.; Devictor, D.; Fabre, M.; Bernard, O. Liver failure in children with hepatitis A. *Hepatology*, **1997**; 26(4): 1018-1022.

- ✓ Delem, A.D. Comparison of modified HAVAB and ELISA for determination of vaccine-induced anti-HAV response. *Biologicals*, **1992**; 20(4): 289-291.
- ✓ Dentinger, C.M. Emerging infections: hepatitis A. *Am. J. Nurs.*, **2009**; 109(8): 29-33.
- ✓ Di Lonardo, A.D.; Marcante, M.L.; Poggiali, F.; Hamsøíková, E.; Venuti, A. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16. *Arch. Virol.*, **2001**; 146(1): 117-125.
- ✓ Dienstag, J.L.; Gust, I.D.; Lucas, C.R.; Wong, D.C.; Purcell, R.H. Mussel-associated viral hepatitis, type A: serological confirmation. *Lancet*, **1976**; 1(7959): 561-563.
- ✓ Dignani, M.C.; Miceli, M.H.; Rosa, C.M.; Gatica, J.; Martinez-Rolon, J.; Pizzolato, M. Loss of hepatitis A virus (HAV) antibodies after peripheral stem cell transplantation (PSCT). *Bone Marrow Transplant*, **2003**; 31(9): 809-812.
- ✓ dos Santos, D.C.; da Silva Gomes Martinho, J.M.; Pacheco-Moreira, L.F.; Carvalho Viana de Araujo, C.; Caroli-Bottino, A.; Pannain, V.L.; Soares Trinta, K.; Gandini, M.; da Costa Neves, P.C.; de Souza Matos, D.C.; Gonçalves Caputo, L.F.; Machado, M.P.; Pinto, M.A. Eosinophils involved in fulminant hepatic failure are associated with high interleukin-6 expression and absence of interleukin-5 in liver and peripheral blood. *Liver. Int.*, **2009**; 29(4): 544-551.
- ✓ Eastcott, J.W.; Holmberg, C.J.; Dewhirst, F.E.; Esch, T.R.; Smith, D.J.; Taubman, M.A. Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. *Vaccine*, **2001**; 19(13-14): 1636-1642.
- ✓ Ellis, M.J.; Livesey, J.H. Techniques for identifying heterophile antibody interference are assay specific: study of seven analytes on two automated immunoassay analyzers. *Clin. Chem.*, **2005**; 51(3): 639-641.
- ✓ Emerson, S.U.; Tsarev, S.A.; Govindarajan, S.; Shapiro, M.; Purcell, R.H. A simian strain of hepatitis A virus, AGM-27, functions as an attenuated vaccine for chimpanzees. *J. Infect. Dis.*, **1996**; 173(3): 592-597.
- ✓ Erhard, M.H.; Schmidt, P.; Zinsmeister, P.; Hofmann, A.; Münster, U.; Kaspers, B.; Wiesmüller, K.-H.; Bessler, W.G.; Stangassinger, M. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. *Poul. Sci.*, **2000**; 79: 1264-1270.
- ✓ Ermeling; B.L.; Steffen, E.K.; Fish, R.E.; Hook, R.R. Evaluation of subcutaneous chambers as an alternative to conventional methods of antibody production in chickens. *Lab. Anim. Sci.*, **1992**; 42(4): 402-407.
- ✓ Faure, E.; Thomas, L.; Xu, H.; Medvedev, A.; Equils, O.; Arditi, M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J. Immunol.*, **2001**; 166(3): 2018-2024.
- ✓ Feinstone, S.M.; Kapikian, A.Z.; Purcell, R.H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science*, **1973**; 182: 1026-1028.

- ✓ Feinstone, S.M.; Daemer, R.J.; Gust, I.D.; Purcell, R.H. Live attenuated vaccine for hepatitis A. *Dev. Biol. Stand.*, **1983**; 54: 429-432.
- ✓ Ferreira, C.T.; Vieira, S.M.; Kieling, C.O.; Silveira, T.R. Hepatitis A acute liver failure: follow-up of paediatric patients in southern Brazil. *J. Viral Hepat.*, **2008**; 15 Suppl 2: 66-68.
- ✓ Findlay, G.M.; Dunlop, J.L.; Brown, H.C. Observations on epidemic catarrhal jaundice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1931**; 25: 7-24.
- ✓ Fischer, M.; Hlinak, A.; Montag, T.; Claros, M.; Schade, R.; Ebner, D. Comparison of standard methods for the preparation of egg yolk antibodies. *Tierarztl. Prax.*, **1996**; 24(4): 411-418.
- ✓ Flehmig, B. Hepatitis A-virus in cell culture: I. propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med. Microbiol. Immunol.*, **1980**; 168(4): 239-248.
- ✓ Fryer, J.; Firca, J.; Leventhal, J.; Blondin, B.; Malcolm, A.; Ivancic, D.; Gandhi, R.; Shah, A.; Pao, W.; Abecassis, M.; Kaufman, D.; Stuart, F.; Anderson, B. IgY antiporcine endothelial cell antibodies effectively block human antiporcine xenoantibody binding. *Xenotransplantation*, **1999**; 6(2): 98-109.
- ✓ Fu, C.H.; Huang, H.; Wang, X.M.; Liu, Y.G.; Wang, Z.G.; Cui, S.J.; Gao, H.L.; Li, Z.; Li, J.P.; Kong, X.G. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. *J. Virol. Methods.*, **2006**; 133(1): 112-115.
- ✓ Fujiwara, K.; Yokosuka, O.; Ehata, T.; Imazeki, F.; Saisho, H.; Miki, M.; Omata, M. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology*, **1997**; 26(6): 1634-1639.
- ✓ Gaspar, A.M.; Vitral, C.L.; Yoshida, C.F.; Schatzmayr, H.G. Fast growth of a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203) in a primate cell line. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1993**; 26(2): 203-206.
- ✓ Gassmann, M.; Thömmes, P.; Weiser, T.; Hübscher, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.*, **1990**; 4(8): 2528-2532.
- ✓ Gauss-Muller, V.; Lottspeich, F.; Deinhardt, F. Characterization of hepatitis A virus structural proteins. *Virology*, **1986**; 155(2): 732-736.
- ✓ Gee, S.C.; Bate, I.M.; Thomas, T.M.; Rylatt, D.B. The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. *Protein Expr. Purif.*, **2003**; 30(2): 151-155.
- ✓ Giles, J.P.; Liebhaver, H.; Krugman.; Lattimer, C. Early Viremia and Viruria in Infectious Hepatitis. *Virology*, **1964**; 24: 107-108.
- ✓ Girard, F.; Batisson, I.; Martinez, G.; Breton, C.; Harel, J.; Fairbrother, J.M. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2006**; 46(3): 340-350.

- ✓ Glikson, M.; Galun, E.; Oren, R.; Tur-Kaspa, R.; Shouval, D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore)*, **1992**; 71(1): 14-23.
- ✓ Goswami, B.B.; Burkhardt III, W.; Cebula, T.A. Identification of genetic variants of hepatitis A virus. *J. Virol. Methods*, **1997**; 65(1): 95-103.
- ✓ Gottstein, B.; Hemmeler, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Z. Parasitenkd.*, **1985**; 71(2): 273-276.
- ✓ Greunke, K.; Braren, I.; Alpers, I.; Blank, S.; Sodenkamp, J.; Bredehorst, R.; Spillner, E. Recombinant IgY for improvement of immunoglobulin-based analytical applications. *Clin. Biochem.*, **2008**; 41(14-15): 1237-1244.
- ✓ Grinde, B.; Stene-Johansen, K.; Sharma, B.; Hoel, T.; Jensenius, M.; Skaug, K. Characterisation of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers--infection by needle sharing? *J. Med. Virol.*, **1997**; 53(1): 69-75.
- ✓ Gruer, L.D.; McKendrick, M.W.; Beeching, N.J.; Geddes, A.M. Relapsing hepatitis associated with hepatitis A virus. *Lancet.*, **1982**; 2(8290): p. 163.
- ✓ Gust, I.D. Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world. *Vaccine*, **1992**; 10 Suppl 1: S56-S58.
- ✓ Hadge, D.; Ambrosius, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins-IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol. Immunol.*, **1984**; 21(8): 699-707.
- ✓ Hadler, S.C.; Webster, H.M.; Erben, J.J.; Swanson, J.E.; Maynard, J.E. Hepatitis A in day-care centers. A community-wide assessment. *N. Engl. J. Med.*, **1980**; 302(22): 1222-1227.
- ✓ Halliday, M.L.; Kang, L.Y.; Zhou, T.K.; Hu, M.D.; Pan, Q.C.; Fu, T.Y.; Huang, Y.S.; Hu, S.L. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.*, **1991**; 164(5): 852-859.
- ✓ Hamal, K.R.; Burgess, S.C.; Pevzner, I.Y.; Erf, G.F. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult. Sci.*, **2006**; 85(8): 1364-1372.
- ✓ Hansen, P.; Scoble, J.A.; Hanson, B.; Hoogenraad, N.J. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J. Immunol. Methods*, **1998**; 215(1-2): 1-7.
- ✓ Harkess, J.; Gildon, B.; Istre, G.R. Outbreaks of hepatitis A among illicit drug users, Oklahoma, 1984-87. *Am. J. Public Health*, **1989**; 79(4): 463-466.
- ✓ Hatta, H.; Kim, M.; Yamamoto, T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric. Biol. Chem.*, **1990**; 54(10): 2531-2535.
- ✓ 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.*, **1993**; 57(3): 450-454.

- ✓ Hatta, H.; Tsuda, K.; Ozeki, M.; Kim, M.; Yamamoto, T.; Otake, S.; Hirasawa, M.; Katz, J.; Childers, N.K.; Michalek, S.M. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, **1997**; 31(4): 268-274.
- ✓ Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **2000**; 408: 740-745.
- ✓ Hemmi, H.; Akira, S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem. Immunol. Allergy*, **2005**; 86: 120-135.
- ✓ Henning, K.J.; Bell, E.; Braun, J.; Barker, N.D. A community-wide outbreak of hepatitis A: risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Am. J. Med.*, **1995**; 99(2): 132-136.
- ✓ Hollinger, F. B.; Ticehurst, J. Hepatitis A virus. *In*: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (ed.). *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven Publishers; **1996**. p. 735-782.
- ✓ Holmes, A.W.; Wolfe, L.; Rosenblate, H.; Deinhardt, F. Hepatitis in marmosets: induction of disease with coded specimens from a human volunteer study. *Science*, **1969**; 165(895): 816-817.
- ✓ Horie, K.; Horie, N.; Abdou, A.M.; Yang, J.O.; Yun, S.S.; Chun, H.N.; Park, C.K.; Kim, M.; Hatta, H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. *J. Dairy. Sci.*, **2004**; 87(12): 4073-4079.
- ✓ Huang, S.N.; Lorenz, D.; Gerety, R.J. Electron and immunoelectron microscopic study on liver tissues of marmosets infected with hepatitis A virus. *Lab. Invest.*, **1979**; 41(1): 63-71.
- ✓ Huang, L.; Fang, X. Immunoaffinity fractionation of plasma proteins by chicken IgY antibodies. *Methods Mol. Biol.*, **2008**; 425: 41-51.
- ✓ Hurni, W.M.; Laufer, D.; Miller, W.J.; Ryan, J.; Watson, B. Anti-hepatitis A in the general population and in hepatitis A vaccinees using saliva and serum as diagnostic media. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1993**; 694: 289-292.
- ✓ Innis, B.L.; Snitbhan, R.; Kunasol, P.; Laorakpongse, T.; Poopatanakool, W.; Kozik, C.A.; Suntayakorn, S.; Suknuntapong, T.; Safary, A.; Tang, D.B.; Boslego, J.W. Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA*, **1994**; 271(17): 1328-1334.
- ✓ Ismail, A.A. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin. Chem.*, **2005**; 51(1): 25-26.
- ✓ Jacobson, I.M.; Nath, B.J.; Dienstag, J.L. Relapsing viral hepatitis type A. *J. Med. Virol.*, **1985**; 16(2): 163-169.
- ✓ Jacobson, S.K.; Buttery, R.; Parry, J.V.; Perry, K.R.; Wreghitt, T.G. Investigation of a hepatitis A outbreak in a primary school by sequential saliva sampling. *Clin. Diagn. Virol.*, **1995**; 3(2): 173-180.

- ✓ Jacobsen, K.H.; Koopman, J.S. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol. Infect.*, **2004**; 132(6): 1005-1022.
- ✓ Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchick, M. Immunologie. 5th ed. Berlin, Heidelberg (Deutschland): Spektrum Akademischer Verlag; **2002**.
- ✓ Jansen, R.W.; Siegl, G.; Lemon, S.M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1990**; 87(8): 2867-2871.
- ✓ Jensenius, J.C.; Andersen, I.; Hau, J.; Crone, M.; Koch, C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods.*, **1981**; 46(1): 63-68.
- ✓ Jiang, X.; Estes, M.K.; Metcalf, T.G. Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**; 53(10): 2487-2495.
- ✓ Jindal, M.; Rana, S.S.; Gupta, R.K.; Das, K.; Kar, P. Serological study of hepatitis A virus infection amongst the students of a medical college in Delhi & evaluation of the need of vaccination. *Indian J. Med. Res.*, **2002**; 115: 1-4.
- ✓ Johnson, P.M.; Faulk, W.P. Rheumatoid factor: its nature, specificity, and production in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1976**; 6(3): 414-430.
- ✓ Joshi, M.S.; et al., Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis A. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2002**; 9(4): 840-845.
- ✓ Jothikumar, N.; Paulmurugan, R.; Padmanabhan, P.; Sundari, R.B.; Kamatchiammal, S.; Rao, K.S. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples. *J. Environ. Monit.*, **2000**; 2(6): 587-590.
- ✓ Kang, J.H.; Lee, K.Y.; Kim, C.H.; Sim, D. Changing hepatitis A epidemiology and the need for vaccination in Korea. *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.*, **2004**; 22(4): 237-242.
- ✓ Kao, H.W.; Ashcavai, M.; Redeker, A.G. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology*, **1984**; 4(5): 933-936.
- ✓ Kapoor, P.; Compton, M.M.; Howarth, B. Immunization of chickens with quail and turkey perivitelline membrane proteins: production of antibodies and their effects on fertility. *Poult. Sci.*, **2000**; 79(2): 245-256.
- ✓ Karetnyi, I.V.; Andzhaparidze, A.G.; Orlova, T.M.; Balaian, M.S. Study of human and simian hepatitis A virus isolated by an immunoenzyme method using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vopr. Virusol.*, **1989**; 34(1): 50-53.
- ✓ 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.*, **2008**; 121(3-4): 290-299.

- ✓ Klemperer, F. XV. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. *In: Naunyn, B.; Schmiedeberg, O. (Eds.). Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmacologie.* 31^a ed. Vogel, Leipzig (Deutschland): Verlag von F.C.W.; **1893**.
- ✓ Klinman, D.M.; Barnhart, K.M.; Conover, J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*, **1999**; 17: 19–25.
- ✓ Kollberg, H.; Carlander, D.; Olesen, H.; Wejåker, P.E.; Johannesson, M.; Larsson, A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr. Pulmonol.*, **2003**; 35(6): 433-440.
- ✓ Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. *J. Immunol. Methods.*, **2005a**; 296(1-2): 199-209.
- ✓ Kovacs-Nolan, J.; Phillips, M.; Mine, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.*, **2005b**; 53(22): 8421-8431.
- ✓ Krugman, S.; Ward, R.; Giles, J.P.; Bodansky, O.; Jacobs, A.M. Infectious hepatitis: detection of virus during the incubation period and in clinically inapparent infection. *N. Engl. J. Med.*, **1959**; 261: 729-734.
- ✓ Krugman, S.; Ward, R.; Giles, J.P. The natural history of infectious hepatitis. *Am. J. Med.*, **1962**; 32: 717-728.
- ✓ Krugman, S.; Giles, J.P.; Hammond, J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*, **1967**; 200(5): 365-373.
- ✓ LaBrecque, F.D.; LaBrecque, D.R.; Klinzman, D.; Perlman, S.; Cederna, J.B.; Winokur, P.L.; Han, J.Q.; Stapleton, J.T. Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. *J. Clin. Microbiol.*, **1998**; 36(7): 2014-2018.
- ✓ Larsson, A.; Sjoquist, J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **1990**; 13(4): 199-201.
- ✓ Larsson, A.; Karlsson-Parra, A.; Sjoquist, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin. Chem.*, **1991**; 37(3): 411-414.
- ✓ Larsson, A.; Wejåker, P.E.; Forsberg, P.O.; Lindahl, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. Immunol. Methods.*, **1992**; 156(1): 79-83.
- ✓ Larsson, A.; Balow, R.M.; Lindahl, T.L.; Forsberg, P.O. Chicken antibodies: taking advantage of evolution - a review. *Poultry Sci.*, **1993**; 72: 1807–1812.
- ✓ Laufer, D.S.; Hurni, W.; Watson, B.; Miller, W.; Ryan, J.; Nalin, D.; Brown, L. Saliva and serum as diagnostic media for antibody to hepatitis A virus in adults and in individuals who have received an inactivated hepatitis A vaccine. *Clin. Infect. Dis.*, **1995**; 20(4): 868-871.

- ✓ Lednar, W.M.; Lemon, S.M.; Kirkpatrick, J.W.; Redfield, R.R.; Fields, M.L.; Kelley, P.W. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am. J. Epidemiol.*, **1985**; 122(2): 226-233.
- ✓ Lee, K.A.; Chang, S.K.; Lee, Y.J.; Lee, J.H.; Koo, N.S. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **2002**; 35(5): 488-493.
- ✓ Lemon, S.M.; Binn, L.N.; Marchwicki, R.H. Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **1983**; 17(5): 834-839.
- ✓ Lemon, S.M.; Whetter, L.; Chang, K.H.; Brown, E.A. Why do human hepatitis viruses replicate so poorly in cell cultures? *FEMS Microbiol. Lett.*, **1992**; 79(1-3): 455-459.
- ✓ Lemon, S.M. The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products. *Vox Sang.*, **1994**; 67 Suppl 4: 19-26.
- ✓ Leslie, G.A.; Clem, L.W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.*, **1969**; 130(6): 1337-1352.
- ✓ Leslie, G.A.; Martin, L.N. Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken. *J. Immunol.*, **1973**; 110(1): 1-9.
- ✓ Lévesque, S.; Martinez, G.; Fairbrother, J.M. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. *Poult. Sci.*, **2007**; 86(4): 630-635.
- ✓ Li, X.; Nakano, T.; Sunwoo, H.H.; Paek, B.H.; Chae, H.S.; Sim, J.S. Effects of Egg and Yolk Weights on Yolk Antibody (IgY) Production in Laying Chickens. *Poultry Sci.*, **1998**; 77(2): 266-70.
- ✓ Li, X.L.; Shuai, J.B.; Fang, W.H. Protection of *Carassius auratus Gibelio* against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.*, **2006**; 7(11): 922-928.
- ✓ Liu, J.P.; Nikolova, D.; Fei, Y. Immunoglobulins for preventing hepatitis A. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2009**; (2): CD004181.
- ✓ Locarnini, S.A.; Coulepis, A.G.; Ferris, A.A.; Lehmann, N.I.; Gust, I.D. Purification of hepatitis A virus from human feces. *Intervirology*, **1978**; 10(5): 300-308.
- ✓ Locarnini, S.A.; Coulepis, A.G.; Kaldor, J.; Gust, I.D. Coproantibodies in hepatitis A: detection by enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.*, **1980**; 11(6): 710-716.
- ✓ Loeken, M.R.; Roth, T.F. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology*, **1983**; 49(1): 21-28.
- ✓ Lösch, U.; Schraner, I.; Wanke, R.; Jürgens, L. The chicken egg, an antibody source. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, **1986**; 33(8): 609-619.
- ✓ Lu, L.; Ching, K.Z.; de Paula, V.S.; Nakano, T.; Siegl, G.; Weitz, M.; Robertson, B.H. Characterization of the complete genomic sequence of

- genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J. Gen. Virol.*, **2004**; 85(Pt 10): 2943-2952.
- ✓ Mackiewicz, V.; et al., Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, **2004**; 42(9): 4329-4331.
 - ✓ Mahmood, M.S.; Siddique, M.; Hussain, I.; Khan, A.; Mansoor, M.K. Protection capability of recombinant plasmid DNA vaccine containing VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus in chickens adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide. *Vaccine*, **2006**; 24(22): 4838-46.
 - ✓ Mann, K.; Mann, M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*, **2008**; 8(1): 178-191.
 - ✓ Margolis, H.S.; Nainan, O.V.; Krawczynski, K.; Bradley, D.W.; Ebert, J.W.; Spelbring, J.; Fields, H.A.; Maynard, J.E. Appearance of immune complexes during experimental hepatitis A infection in chimpanzees. *J. Med. Virol.*, **1988**; 26(3): 315-326.
 - ✓ Margolis, H. S. Viral hepatitis. In Wallace, R.B.; Doebbeling, B.N. (ed.). Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine. 14th ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; **2000**. p. 174–188.
 - ✓ Martin, A.; Lemon, S.M. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*, **2006**; 43(2 Suppl 1): S164-S172.
 - ✓ McCaustland, K.A.; Bond, W.W.; Bradley, D.W.; Ebert, J.W.; Maynard, J.E. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J. Clin. Microbiol.*, **1982**; 16(5): 957-958.
 - ✓ McCully, K.A.; Mok, C.C.; Common, R.H. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1962**; 40(7): 937-952.
 - ✓ Medzhitov, R.; Janeway, C.A.Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **1997**; 91(3): 295-298.
 - ✓ Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food.*, **2002**; 5(3): 159-169.
 - ✓ Mohammed, M.S.; Morrison, S.L.; Wims, L.A.; Trinh, R.; Wildeman, A.G.; Bonselaar, J.; Etches, R. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*, **1998**; 4(2): 115-125.
 - ✓ Moldoveanu, Z.; Love-Homan, L.; Huang, W.Q.; Krieg, A.M. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*, **1998**; 16(11-12): 1216-1224.
 - ✓ Morrison, S.L.; Mohammed, M.S.; Wims, L.A.; Trinh, R.; Etches, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.*, **2001**; 38(8): 619-625.
 - ✓ Murata, T.; Saito, S.; Shiozaki, M.; Lu, R.Z.; Eto, Y.; Funaba, M.; Takahashi, M.; Torii, K. Anti-activin A antibody (IgY) specifically neutralizes various activin A activities. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1996**; 211(1): 100-107.

- ✓ Nainan, O.V.; Margolis, H.S.; Robertson, B.H.; Balayan, M.; Brinton, M.A. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.*, **1991**; 72(Pt 7): 1685-1689.
- ✓ Nainan, O.V.; Brinton, M.A.; Margolis, H.S. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology*, **1992**; 191(2): 984-987.
- ✓ Nainan, O.V.; Armstrong, G.L.; Han, X.H.; Williams, I.; Bell, B.P.; Margolis, H.S. Hepatitis a molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *J. Infect. Dis.*, **2005**; 191(6): 957-963.
- ✓ Nainan, O.V.; Xia, G.; Vaughan, G.; Margolis, H.S. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2006**; 19(1): 63-79.
- ✓ Najarian, R.; Caput, D.; Gee, W.; Potter, S.J.; Renard, A.; Merryweather, J.; Van Nest, G.; Dina, D. Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1985**; 82(9): 2627-2631.
- ✓ Nalin, D.R.; Kuter, B.J.; Brown, L.; Patterson, C.; Calandra, G.B.; Werzberger, A.; Shouval, D.; Ellerbeck, E.; Block, S.L.; Bishop, R.; Wiens, B.; Schwartz, S.W.; Lewis, J.A.; Sitrin, R.D.; Provost, P.J.; Miller, W.J.; Ryan, J.L. Worldwide experience with the CR326F-derived inactivated hepatitis A virus vaccine in pediatric and adult populations: an overview. *J. Hepatol.*, **1993**; 18 Suppl 2: S51-S55.
- ✓ Nilsson, L.; Osmark, P.; Fernandez, C.; Andersson, M.; Bergenståhl, B. Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. *J. Agric. Food. Chem.*, **2006**; 54(18): 6881-6887.
- ✓ Nilsson, L.; Osmark, P.; Fernandez, C.; Bergenståhl, B. Competitive adsorption of proteins from total hen egg yolk during emulsification. *J. Agric. Food. Chem.*, **2007**; 55(16): 6746-6753.
- ✓ Nilsson, E.; Hanrieder, J.; Bergquist, J.; Larsson, A. Proteomic characterization of IgY preparations purified with a water dilution method. *J. Agric. Food Chem.*, **2008a**; 56(24): 11638-11642.
- ✓ Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H.V.; Wejåker, P.E.; Kollberg, H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.*, **2008b**; 43(9): 892-899.
- ✓ Oba, I.T.; Spina, A.M.; Saraceni, C.P.; Lemos, M.F.; Senhoras, R.; Moreira, R.C.; Granato, C.F. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **2000**; 42(4): 197-200.
- ✓ Ochnio, J.J.; Scheifele, D.W.; Ho, M.; Mitchell, L.A. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, **1997**; 35(1): 98-101.
- ✓ O'Grady, J. Management of acute and fulminant hepatitis A. *Vaccine*, **1992**; 10 Suppl 1: S21-S23.

- ✓ O'Grady, J. Modern management of acute liver failure. *Clin. Liver Dis.*, **2007**; 11(2): 291-303.
- ✓ Olbrich, C.; Müller, R.H.; Tabatt, K.; Kayser, O.; Schulze, C.; Schade, R. Stable biocompatible adjuvants--a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *Altern. Lab. Anim.*, **2002**; 30(4): 443-458.
- ✓ Patterson, R.; Youngner, J.S.; Weigle, W.O.; Dixon, F.J. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. *J. Gen. Physiol.*, **1962a**; 45: 501-513.
- ✓ Patterson, R.; Youngner, J.S.; Weigle, W.O.; Dixon, F.J. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.*, **1962b**; 89: 272-278.
- ✓ Pauly, D.; Dorner, M.; Zhang, X.; Hlinak, 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.*, **2009**; 88(2): 281-290.
- ✓ Perry, K.R.; Parry, J.V.; Vandervelde, E.M.; Mortimer, P.P. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. *J. Med. Virol.*, **1992**; 38(4): 265-270.
- ✓ Pham, B.; Duval, B.; De Serres, G.; Gilca, V.; Tricco, A.C.; Ochnio, J.; Scheifele, D.W. Seroprevalence of hepatitis A infection in a low endemicity country: a systematic review. *BMC Infect. Dis.*, **2005**; 5: 56.
- ✓ Ping, L.H.; Jansen, R.W.; Stapleton, J.T.; Cohen, J.I.; Lemon, S.M. Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**; 85(21): 8281-8285.
- ✓ Ping, L.H.; Lemon, S.M. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.*, **1992**; 66(4): 2208-2216.
- ✓ Pinto, M.A.; Marchevsky, R.S.; Baptista, M.L.; de Lima, M.A.; Pelajo-Machado, M.; Vitral, C.L.; Kubelka, C.F.; Pissurno, J.W.; Franca, M.S.; Schatzmayr, H.G.; Gaspar, A.M. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **2002**; 53(6): 413-420.
- ✓ Poddar, U.; Thapa, B.R.; Prasad, A.; Singh, K. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J. Trop. Pediatr.*, **2002**; 48(4): 210-213.
- ✓ Polson, A.; Coetzer, T.; Kruger, J.; von Maltzahn, E.; van der Merwe, K.J. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Invest.*, **1985**; 14(4): 323-327.
- ✓ Polson, A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.*, **1990**; 19(3): 253-258.
- ✓ Probst, C.; Jecht, M.; Gauss-Muller, V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J. Biol. Chem.*, **1999**; 274(8): 4527-4531.

- ✓ Provost, P.J.; Hilleman, M.R. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1979**; 160(2): 213-221.
- ✓ Purcell, R.H.; Wong, D.C.; Moritsugu, Y.; Dienstag, J.L.; Routenberg, J.A.; Boggs, J.D. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J. Immunol.*, **1976**; 116(2): 349-356.
- ✓ Qureshi, A.I.; Suri, F.K.; Ahmed, S.; Nasar, A.; Divani, A.A.; Kirmani, J.F. Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Med. Sci. Monit.*, **2007**; 13(1): CR1-8.
- ✓ Rankin, R.; Pontarollo, R.; Ioannou, X.; Krieg, A.M.; Hecker, R.; Babiuk, L.A.; van Drunen Littel-van den Hurk, S. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **2001**; 11(5): 333-340.
- ✓ Rezende, G.; Roque-Afonso, A.M.; Samuel, D.; Gigou, M.; Nicand, E.; Ferre, V.; Dussaix, E.; Bismuth, H.; Féray, C. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology*, **2003**; 38(3): 613-618.
- ✓ Robertson, B.H.; Jansen, R.W.; Khanna, B.; Totsuka, A.; Nainan, O.V.; Siegl, G.; Widell, A.; Margolis, H.S.; Isomura, S.; Ito, K.; Ishizu, T.; Moritsugu, Y.; Lemon, S.M. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.*, **1992**; 73 (Pt 6): 1365-1377.
- ✓ Rollier, C.; Charollois, C.; Jamard, C.; Trepo, C.; Cova, L. Early life humoral response of ducks to DNA immunization against hepadnavirus large envelope protein. *Vaccine*, **2000**; 18(27): 3091-3096.
- ✓ Rose, M.E.; Orlans, E.; Buttress, N. Immunoglobulin classes on the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, **1974**; 4: 521-523.
- ✓ Rose, M.E.; Orlans, E. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Dev. Comp. Immunol.*, **1981**; 5: 15-20.
- ✓ Rosol, T.J.; Steinmeyer, C.L.; McCauley, L.K.; Merryman, J.I.; Werkmeister, J.R.; Gröne, A.; Weckmann, M.T.; Swayne, D.E.; Capen, C.C. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **1993**; 35(3-4): 321-337.
- ✓ Ruttimann, R.W.; Clemens, R.L. Argentine and Latin American hepatitis A. *J. Travel. Med.*, **2002**; 9(4): 220.
- ✓ Sánchez, G.; Pintó, R.M.; Vanaclocha, H.; Bosch, A. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, **2002**; 40(11): 4148-4155.
- ✓ Schade, R.; Bürger, W.; Schöneberg, T.; Schniering, A.; Schwarzkopf, C.; Hlinak, A.; Kobilke, H. 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.*, **1994**; 11(2): 75-84.
- ✓ Schade, R.; Hlinak, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *Altex.*, **1996**; 13(5): 5-9.

- ✓ Schade, R.; Calzado, E.G.; Sarmiento, R.; Chacana, P.A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.*, **2005**; 33(2): 129-154.
- ✓ Schultheiss, T.; Kusov, Y.Y.; Gauss-Muller, V. Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology*, **1994**; 198(1): 275-281.
- ✓ Shah, U.; Habib, Z. Liver failure attributable to hepatitis A virus infection in a developing country. *Pediatrics*, **2000**; 105(2): 436-438.
- ✓ Shah, R.B.; Khan, M.A. Protection of salmon calcitonin breakdown with serine proteases by various ovomucoid species for oral drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **2004**; 93(2): 392-406.
- ✓ Shimizu, M.; Nakai, S.; Fitzsimmons, R.C. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.*, **1988**; 53(5): 1360-1366.
- ✓ Shimizu, M.; Nagashima, H.; Sano, K.; Hashimoto, K.; Ozeki, M.; Tsuda, K.; Hatta, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1992**; 56(2): 270-274.
- ✓ Shimizu, M.; Nagashima, H.; Hashimoto, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **1993**; 106(2): 255-261.
- ✓ Shimizu, M.; Nagashima, H.; Hashimoto, K.; Suzuki, T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. *J. Food Sci.*, **1994**; 59(4): 763-772.
- ✓ Shin, J.H.; Yang, M.; Nam, S.W.; Kim, J.T.; Myung, N.H.; Bang, W.G.; Roe, I.H. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2002**; 9(5): 1061-1066.
- ✓ Shin, J.H.; Nam, S.W.; Kim, J.T.; Yoon, J.B.; Bang, W.G.; Roe, I.H. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H. pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J. Med. Microbiol.*, **2003**; 52(Pt 3): 217-222.
- ✓ Shin, S.J.; Lee, S.S.; Manning, E.J.; Collins, M.T. Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Microbiol.*, **2009**; 47(5): 600-609.
- ✓ Siegl, G.; deChastonay, J.; Kronauer, G. Propagation and assay of hepatitis A virus in vitro. *J. Virol. Methods*, **1984**; 9(1): 53-67.
- ✓ Sim, J.S.; Sunwoo, H.H.; Lee, E.N. Ovoglobulin Y. In: Naidu, A.S. (ed.). Natural food antimicrobial systems. New York (USA): CRC Press; **2000**. p. 227-252.
- ✓ Sjogren, M.H.; Tanno, H.; Fay, O.; Sileoni, S.; Cohen, B.D.; Burke, D.S.; Feighny, R.J. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann. Intern. Med.*, **1987**; 106(2): 221-226.

- ✓ Skinhoj, P.; Mikkelsen, F.; Hollinger, F.B. Hepatitis A in Greenland: importance of specific antibody testing in epidemiologic surveillance. *Am. J. Epidemiol.*, **1977**; 105(2): 140-147.
- ✓ Skinhoj, P.; Mathiesen, L.R.; Kiryger, P.; Moller, A.M. Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand. J. Gastroenterol.*, **1981**; 16: 1057-1059.
- ✓ Song, W.O.; Kerver, J.M. Nutritional contribution of eggs to american diets. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2000**; 19(5 Suppl): 556S-562S.
- ✓ Staak, C. Egg Yolk Antibodies (IgY) in Routine Diagnostic Work. *Altex.*, **1996**; 13(5): 73-75.
- ✓ Stapleton, J.T.; Lemon, S.M. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. *J. Virol.*, **1987**; 61(2): 491-498.
- ✓ Stapleton, J.T.; Lange, D.K.; LeDuc, J.W.; Binn, L.N.; Jansen, R.W.; Lemon, S.M. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.*, **1991**; 163(1): 7-11.
- ✓ Stapleton, J.T. Host immune response to hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.*, **1995**; 171 Suppl 1: S9-S14.
- ✓ Steffen, R.; Kane, M.A.; Shapiro, C.N.; Billo, N.; Schoellhorn, K.J.; van Damme, P. Epidemiology and prevention of hepatitis A in travelers. *JAMA*, **1994**; 272(11): 885-889.
- ✓ Stockwin, L.H.; Holmes, S. Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance! *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **2003a**; 3(7): 1133-1152.
- ✓ Stockwin, L.H.; Holmes, S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem. Soc. Trans.*, **2003b**; 31(2): 433-436.
- ✓ Strazynski, M.; Kramer, J.; Becker, B. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**; 74(1-2): 73-78.
- ✓ Stuart, C.A.; Pietrzyk, R.A.; Furlanetto, R.W.; Green, A. High affinity antibody from hen's eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-I receptor. *Anal. Biochem.*, **1988**; 173(1): 142-150.
- ✓ Sugita-Konishi, Y.; Ogawa, M.; Arai, S.; Kumagai, S.; Igimi, S.; Shimizu, M. Blockade of Salmonella enteritidis passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. *Microbiol. Immunol.*, **2000**; 44(6): 473-479.
- ✓ 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.*, **2001**; 15(9): 708-712.
- ✓ Sundkvist, T.; Aitken, C.; Duckworth, G.; Jeffries, D. Outbreak of acute hepatitis A among homosexual men in East London. *Scand. J. Infect. Dis.*, **1997**; 29(3): 211-212.

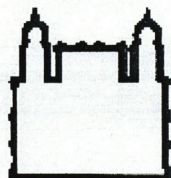
- ✓ Sunwoo, H.H.; Nakano, T.; Dixon, W.T.; Sim, J.S. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.*, **1996**; 75(3): 342-345.
- ✓ Suzuki, H.; Nomura, S.; Masaoka, T.; Goshima, H.; Kamata, N.; Kodama, Y.; Ishii, H.; Kitajima, M.; Nomoto, K.; Hibi, T. Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **2004**; 20(1): 185-192.
- ✓ Svendsen, L.; Crowley, A.; Ostergaard, L.H.; Stodulski, G.; Hau, J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab. Anim. Sci.*, **1995**; 45(1): 89-93.
- ✓ Svendsen, L.; Crowley, A.; Stodulski, G.; Hau, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J. Immunol. Methods.*, **1996**; 191(2): 113-120.
- ✓ Tanaka, J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine*, **2000**; 18 Suppl 1: S57-S60.
- ✓ Tapia-Conyer, R.; Santos, J.I.; Cavalcanti, A.M.; Urdaneta, E.; Rivera, L.; Manterola, A.; Potin, M.; Ruttiman, R.; Tanaka, J. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1999**; 61(5): 825-829.
- ✓ Tassopoulos, N.C.; Papaevangelou, G.J.; Ticehurst, J.R.; Purcell, R.H. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J. Infect. Dis.*, **1986**; 154(2): 231-237.
- ✓ Tesar, D.B.; Cheung, E.J.; Bjorkman, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **2008**; 19(4): 1587-1593.
- ✓ Tini, M.; Jewell, U. R.; Camenisch, G.; Chilov, D.; Gassmann, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **2002**; 131(3): 569-574.
- ✓ Totsuka, A.; Moritsugu, Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*, **1999**; 42(2-3): 63-68.
- ✓ Tressler, R.L.; Roth, T.F. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J. Biol. Chem.*, **1987**; 262(32): 15406-15412.
- ✓ Tsarev, S.A.; Emerson, S.U.; Balayan, M.S.; Ticehurst, J.; Purcell, R.H. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J. Gen. Virol.*, **1991**; 72 (Pt 7): 1677-1683.
- ✓ van den Anker, J.N.; Sukhai, R.N.; Dumas, A.M. Relapsing hepatitis in a child, associated with isolation of hepatitis A virus antigen from the liver. *Eur. J. Pediatr.*, **1988**; 147(3): 333.
- ✓ Verdoliva, A.; Basile, G.; Fassina, G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **2000**; 749(2): 233-242.

- ✓ Vincent, I.E.; et al., Inhibitory effect of the combination of CpG-induced cytokines with lamivudine against hepatitis B virus replication in vitro. *Antivir. Ther.*, **2009**; 14(1): 131-135.
- ✓ Visintin, A.; Mazzoni, A.; Spitzer, J.H.; Wyllie, D.H.; Dower, S.K.; Segal, D.M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.*, **2001**; 166(1): 249-255.
- ✓ Vitral, C.L.; Gaspar, A.M.; Souto, F.J. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2006**; 101(2): 119-127.
- ✓ Voegt, H. Zur aetiologie der hepatitis epidemica. *Muench. Med. Wochenschr.*, **1942**; 89: 76-79.
- ✓ Wang, C.H.; Tschen, S.Y.; Heinrich, U.; Weber, M.; Flehmig, B. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection. *J. Clin. Microbiol.*, **1996**; 34(3): 707-713.
- ✓ Wanke, R.; Schmidt, P.; Erhard, M.H.; Sprick-Sanjose Messing, A.; Stangassinger, M.; Schmahl, W.; Hermanns, W. Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, **1996**; 43(4): 243-253.
- ✓ Warr, G.W.; Magor, K.E.; Higgins, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today*, **1995**; 16(8): 392-398.
- ✓ Wasley, A.; Samandari, T.; Bell, B.P. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA*, **2005**; 294(2): 194-201.
- ✓ Weber, D.J.; Barbee, S.L.; Sobsey, M.D.; Rutala, W.A. The effect of blood on the antiviral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quaternary ammonium compound. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **1999**; 20(12): 821-827.
- ✓ Weitz, M.; Baroudy, B.M.; Maloy, W.L.; Ticehurst, J.R.; Purcell, R.H. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J. Virol.*, **1986**; 60(1): 124-130.
- ✓ West, A.P.Jr.; Herr, A.B.; Bjorkman, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. *Immunity*, **2004**; 20(5): 601-610.
- ✓ Williams, E.; Questa, H.; Wacholder, V.; Rojas, L.; Cervio, G.; Bianco, G.; Inventarza, O. Development of a pediatric liver transplantation program in Argentina. *Pediatr. Surg. Int.*, **1998**; 13(5-6): 319-322.
- ✓ Wolfle, T.L.; Rozmiarek, C.M. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C. (USA): The National Academies Press; **1996**.
- ✓ 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. Hepatitis A vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, **2000**; 75(5): 38-44.

- ✓ Wu, F.; Yuan, X.Y.; Li, J.; Chen, Y.H. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. *Vaccine*, **2009**; 27(32): 4320-4324.
- ✓ Yamamoto, H.; Watanabe, H.; Sato, G.; Mikami, T. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Jpn. J. Vet. Res.*, **1975**; 23(4): 131-140.
- ✓ Yokoyama, H.; Peralta, R.C.; Umeda, K.; Hashi, T.; Icatlo, F.C.Jr.; Kuroki, M.; Ikemori, Y.; Kodama, Y. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, **1998a**; 59(4): 416-420.
- ✓ Yokoyama, H.; Umeda, K.; Peralta, R.C.; Hashi, T.; Icatlo, F.C.Jr.; Kuroki, M.; Ikemori, Y.; Kodama, Y. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. *Vaccine*, **1998b**; 16(4): 388-393.
- ✓ Yotsuyanagi, H.; Iino, S.; Koike, K.; Yasuda, K.; Hino, K.; Kurokawa, K. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **1993**; 40(1): 35-38.

8. ANEXO I

Certificado de aprovação pelo CEUA-FIOCRUZ do projeto que envolveu os macacos cynomolgus.



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº **P-0257/05**, intitulado “**Inovabio: Desenvolvimento de vacina inativada contra vírus da hepatite A**” sob a responsabilidade do **Dr. Marcelo Alves Pinto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)**. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 10 de outubro de 2010.

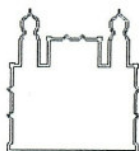
Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2006.

Dr. Octávio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

Avenida Brasil nº 4365 - Mourisco - sala 07 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil
Tel: (+55) 21.3885-1698 - FAX: (+55) 21. 2590-9490 E. mail: ceua@fiocruz.br

9. ANEXO II

Certificado de aprovação pelo CEP-FIOCRUZ do projeto que envolveu pacientes de hepatite fulminante.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 19 de abril de 2004.

PARECER

Título do Projeto: "Avaliação dos Aspectos Imunopatológicos Envolvidos em Quadros de Hepatite Aguda com Evolução para Falência Hepática Fulminante"

Protocolo CEP: 222/03

Pesquisador Responsável: Marcelo Alves Pinto

Instituição: IOC

Deliberação: APROVADO

Trata-se de um projeto de doutorado, que pretende avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na gênese da hepatite fulminante. O propósito do projeto é relevante na medida em que implica realizar uma reavaliação de estratégias terapêuticas nesses casos específicos.

Os *Curricula vitae* dos participantes são adequados para o desenvolvimento do projeto.

Metodologicamente, trata-se de um estudo que utilizará dados retrospectivos e amostras colhidas prospectivamente. No primeiro caso, serão analisadas amostras de tecido hepático de necropsia arquivadas nos serviços de anatomia patológica de dois hospitais: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e Hospital Geral de Bonsucesso. Utilizará ainda, os dados do prontuário desses indivíduos submetidos à necropsia.

No segundo caso, serão colhidas amostras do fígado explantadas de indivíduos que serão submetidos a transplante hepático, bem como amostras de soro para análise das provas de função hepática e dosagem de citocinas no soro.

Em resposta enviada pelo pesquisador responsável às pendências suscitadas por este colegiado foi feita análise por este Comitê, e tendo por referência as diretrizes e normas da resolução CNS196/96, foi decidido pela **APROVAÇÃO** do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida para apreciação do CEP/FIOCRUZ.


José Luiz Telles de Almeida
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz

Certificado de aprovação pelo CEP-UFRJ do projeto que envolveu pacientes de hepatite fulminante.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:
☒ Luiz Carlos Duarte
de Miranda

Médico - Prof. Adjunto

Secretário:
☒ Mário Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista

Membros Titulares:
☒ Alice Helena Dutra Viçente

Médico - Prof. Adjunto
☐ Antonio de Magalhães
Machado

Enfermeiro - Mestre
☒ Beatriz Moritz Trepe
Médico - Doutorando

☐ Eduardo Jorge Bentes
Chaves

Médico - Prof. Assistente
☒ Elton Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre

☒ Gláucio Rosa
Nutricionista - Prof.

Adjunto
☒ Luiz Bonfim Pereira da
Cunha

Médico -
☐ Maria de Fátima Gustavo
Lopes

Representante dos Usuários
☒ Nereu Gilberto de Moraes
Guerra Neto

Médico - Prof. Assistente
☐ Rita Neli Chaves de
Azevedo

Odonatologista - Prof. Adjunto
Membros Suplentes

☐ Alberto Karyem Arboz
Médico - Doutorando

☐ Claudio Miguel Avila
Médico - Prof. Adjunto

☒ Daniel Savignon Marinho
Farmacêutico -
Nascimento

Odonatologista - Prof. Adjunto
☐ Guilherme Pinto Bravo
Neto

Médico - Prof. Adjunto
☒ Helena Warzysky

Representante dos Usuários
☐ Ivan Miyahira

Médico - Prof. Assistente
☐ Luzia da Conceição de
Araújo Marques

Enfermeiro - Mestre
☐ Roberto Coury Pedron
Médico - Doutor

☒ Vania Dias de Oliveira
Assistente Social

CEP - MEMO - nº 195/04

Rio de Janeiro, 17 de maio de 2004.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr.(a) Pesquisador(a) Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa

Sr.(a) Pesquisador(a),

Informo a V. Sa. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 216/03 - CEP

Título: "Avaliação dos aspectos imunopatológicos envolvidos em quadros de hepatite aguda com evolução para falência hepática fulminante".

Pesquisador (a) responsável: Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos

Data de apreciação do parecer: 15/04/04

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 15/10/04, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII.13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

Certificado de aprovação pelo Hospital Geral de Bonsucesso do projeto que envolveu pacientes de hepatite fulminante.



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
HOSPITAL GERAL DE BONSUCCESSO
DIREÇÃO DE ENSINO E PESQUISA**

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2004.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz

TERMO DE COMPROMISSO

Título da pesquisa: Avaliação dos aspectos imunológicos envolvidos em quadros de hepatite aguda com evolução para falência hepática fulminante.

O Hospital Geral de Bonsucesso tem interesse em participar, como Instituição colaboradora, da pesquisa supracitada. Nesta Instituição, será feito o recrutamento de pacientes atendidos pelo serviço de Cirurgia Hepato-biliar com diagnóstico de hepatite fulminante. Caso o paciente ou seus familiares concordem com o termo de consentimento livre e esclarecido, serão colhidos e ofertados aos pesquisadores da Fiocruz, amostras de sangue e parte do explante hepático, para serem utilizados na pesquisa.

Declaro também que tenho conhecimento de todas as etapas a serem desenvolvidas nesta Instituição, as quais constam do corpo do projeto.

Sendo assim, a Instituição se compromete a colaborar para que a pesquisa se desenvolva dentro de todos os aspectos éticos estabelecidos por este Comitê.

Dr. Victor Grábois

Diretor do HGB

10. ANEXO III

Artigo submetido ao “Journal of Virological Methods”.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico
em Virologia

Rio de Janeiro, March, 4, 2010

Dear Editor,

We would like to submit our new manuscript: “**Biotechnology applied to production of IgY Anti-HAV**” to Journal of Virological Methods. We are sure that your opinion about this article could be grateful for us.

Sincerely,

Marcelo Alves Pinto, DVM., PhD.
Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Avenida Brasil, 4365 - Manguinhos
Rio de Janeiro – RJ , CEP 21045-900
Tel: 0055 021 25621924
Fax: 0055 021 22706397
e-mail: marcelop@ioc.fiocruz.br.

Biotechnology applied to production of IgY Anti-HAV

Vanessa Salete de Paula¹, Alexandre dos Santos da Silva¹, Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos¹, Ézio Tavares Iff², Maria Eduarda Vasconcelos², Livia Abud Kappel^{1,2} Paula Borba Cruz¹ and Marcelo Alves Pinto^{1,2}.

¹Oswaldo Cruz Institute/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

²Disciplina de Farmacologia Veterinária - UNIFESO

Running title: IgY anti-HAV production

Correspondence to: Dr. Marcelo Alves Pinto

e-mail: marcelop@ioc.fiocruz.br

Adress: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Pav. Helio e Peggy Pereira

Av. Brasil, 4365, Manguinhos.

CEP: 21045-900

Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

A protocol to prepare yolks IgY against hepatitis A virus (HAV) was established. Twenty chicks were immunized three times, with a commercial HAV vaccine and also with HAV from cell culture associated with three adjuvants: dinucleotides (CPG-ODN), incomplete Freund's adjuvant (IFA) and alum (included in commercial vaccines). In each of the two last immunizations blood was collected and tested to a total of HAV antibodies. A total of 1406 eggs were collected. The egg yolk was separated and the IgY antibody purified by PEG-6000 precipitation method. The mean yield of protein in yolk was 22,616 mg/mL. The bioactivity of the antibody was tested using ELISA and Western Blotting. Birds immunized with HAV from cell culture plus IFA with/without CPG-ODN showed the highest levels of IgY anti-HAV in serum after first immunization ($p<0.05$). In addition the *in vitro* neutralization assay demonstrated that yolk anti-HAV IgY bound specifically to HAV blocking replication in cell culture. The viral combination of CPG-ODN resulted in early serum anti-HAV response in chickens that reflected in amount of yolk IgY transferred ($p<0.05$). In summary, our results suggest that IgY anti-HAV may be used as a novel tool for research, diagnostic and immunotherapy to hepatitis A infection.

Key words: hepatitis A virus, IgY, CPG-ODN

Introduction

Hepatitis A virus (HAV) is a non enveloped RNA virus 27 to 32 nm diameter in size, of icosahedra symmetry, which belongs to the genus *Hepatovirus* of the *Picornaviridae* family (Hollinger and Emerson, 2001). HAV replicates in the liver and is excreted into the stools. Hepatitis A virus can be stable in the environment for several months and is able to survive in freezing conditions (Hutin et al., 1999). It's also transmitted through fecal-oral route via person-to-person contact, or by ingesting contaminated food or water (Wheeler et al., 2005). The majority of the world's population is still at moderate-to-high risk for hepatitis A virus infection (Hendrickx et al., 2008).

The purified immunoglobulin anti-HAV has been used as key component of diagnostic assay and recommended for post exposure prophylaxis. However, the production of

immunoglobulin (IgG) has been limited and expensive, there is a general consensus to avoid human blood-derived products in passive immune therapy (Victor et al., 2007).

Chicken egg yolk antibodies have been used as an alternative to mammalian IgG in prophylaxis and immunological tests for different infectious diseases (Cova, 2005). The IgY antibodies are the avian counterpart of mammalian IgG, being the predominant immunoglobulin serum in birds, reptiles and amphibians. Immunoglobulin are transferred from the dam's plasma to egg yolk by a chicken yolk sac IgY receptor (FcRY) to confer passive immunity to offsprings (Loeken and Roth, 1983; Patterson et al., 1962; Tesar et al., 2008; West et al., 2004). Comparatively, this process corresponds to placental or colostrums IgG transfer in mammals (Leslie and Clem, 1969), other authors have considered IgY as an evolutionary ancestor of mammalian IgG and IgA antibodies (Warr et al., 1995).

The factors which make yolks potential specific immunoglobulin source are: high immunoglobulin content, which is approximately of 10 mg/mL (Otake et al., 1991); better immune responsiveness to mammalian antigens (Gassmann et al., 1990); high affinity antibodies with persistent titer (Gassmann et al., 1990; Hatta et al., 1993) and the possibility of collecting large numbers of chicken eggs per experiment.

Many researchers have already developed specific IgY antibodies from immunized hens. The approach of IgY production has been considered favorable to animal welfare due the fact that such procedures are non-invasive and non-stressful for the animals and for the human handler (Zhang, 2003), distinct from procedures where animals are bled and immunized each time for the production of antiserum.

Adjuvants are compounds that improve the immune response against co-inoculated antigens. The literature classifies adjuvants in different categories – mineral salts, tensoactive compounds, microorganism-derived adjuvants, emulsions, particulate antigen delivery systems, cytokines, polysaccharides, nucleic acid-based adjuvants and adjuvants formulations (Aguilar and Rodriguez, 2007; Petrovsky and Aguilar, 2004). Oligonucleotides containing dinucleotide (CpG) can enhance the production of antibodies by agonistic effect on TLR/9 that lead to enhanced antigen-specific B-cell proliferation and differentiation to form extra follicular plasma cells (Eckl-Dorna and Batista, 2009; Johnson et al., 2009; Vleugels et al., 2002; Wang et al., 2009). Unmethylated CpG motifs represent a signature of non-host DNA (Pathogen –Associated Molecular Patterns- PAMPs). Thus, synthetic oligonucleotides sequence containing CG sequences (ODN) are interpreted as a signal of invasion by the innate

immune system and consequently activates defense mechanisms (Heeg et al., 2008; Krieg et al., 1995). Others adjuvants as Alum, incomplete as well as complete Freund's have been described as potent inducers of immunogenicity due a dependent TLR2 and TLR4 agonistic activity (Tsuji et al., 2000). Recently, intracellular receptors, such as nucleotide-binding oligomerization receptors (NLRs), which detect muramylpeptides released from bacteria wall and retinoic-acid-inducible protein 1 receptor (RIG-I-like receptor or RLRs) an intracellular detector of single-stranded RNA of viral origin, have been pointed as involved in adjuvant immunomodulatory effects (Ferwerda et al., ; Garlapati et al., 2009; Ishii and Akira, 2007; Xiao, 2009). In this study, we evaluate the viability of IgY anti-HAV production in yolk. The immune response of hens treated with HAV antigen mixed with adjuvants was evaluated by IgY anti-HAV titers in samples of serum and egg yolks.

Material and Methods

Chickens

Twenty clinically healthy 02 weeks old outbreed Isa Brown laying chicks were purchased from a commercial breeding company. These chickens were divided in five groups of four female hens each, weighing around 0.143 - 0.220 kg and kept in animal facilities at the Veterinary Medicine School of Centro Universitário Serra dos Órgãos –UNIFESO, Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil. One week before the beginning of the experiment all hens were housed individually in appropriately designed cages, with 12h light to 12h darkness, at room temperature around 24°C and relative humidity of 70-80%. All chicks were vaccinated against Fowlpox virus and New Castle disease. Water and commercial food were offered “ad libitum” considering the life stage of each bird. Animals were gently checked on a weekly basis in order to monitor the gain in body weight and to collect a small account (1mL) of blood from vein of wings to confirm the efficacy of HAV immunization before the egg laying period. The hens were euthanized at 31 weeks old, 16 weeks after the beginning of egg laying period, under deep anesthesia. All experimental procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of laboratory Animals (Wolfe and Rozmiarek, 1996).

Antigen preparation and immunization schedule

The twenty laying chicks included in this study were divided in five groups of four chicks each *i.e.* five different immunization protocols: group I – 200 µL of commercial pediatric HAV vaccine (Merck & Co. Inc. West Point, PA, US) was associated to 20µL CPG ODN (1mg/mL) (Integrate DNA Technologies, US); group II – commercial pediatric HAV vaccine; group III – 100µL of HAV (10^5 copies/mL) associated with incomplete Freund's adjuvant (100µL) (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, US) and CPG ODN (20µL); group IV – 100µL of HAV associated to incomplete Freund's adjuvant (20µL); group V – incomplete Freund's adjuvant (100µL) without virus or vaccine as negative control. The HAV (HAF-203 Brazilian strain, accession number: GenBank AF268396) administrated in birds was produced in cell culture (FRhK-4) with 10^5 copies/mL (Gaspar et al., 1993). A total volume of 220 µL was administrated intramuscularly in deep pectoral muscle, chosen for route of immunization for all groups. The first immunization was done when chicks were 03 weeks old, two boosters were programmed to be done at 07 and 11 weeks old respectively. Hens were weighed and bled (1mL) via the wing vein before each immunization. Eggs were collected daily, beginning at 30 days after the third immunization throughout 16 weeks and stored at 4°C until use. Egg yolks were separated from the whites and stored at -20 °C. After this period the birds were killed by exsanguination, under deep anesthesia. The necropsy was performed at the Laboratory of Pathology of Veterinary Medicine School of Centro Universitário Serra dos Órgãos, Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil. In this procedure, samples of liver, bursa of Fabricius, kidney and spleen were collected, fixed in 10% buffer formalin, and stored in paraffin blocks for further conventional histological analysis by optical microscopy.

Detection of anti-HAV IgY antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assay.

In order to monitor the seroconversion, the collected blood samples were centrifuged at 5.000 rpm for 10min at 4°C. The serum was transferred to a 1.5mL tube and stored at -20°C. HAV specific IgY antibodies in serum samples from immunized hens were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Biokit, Barcelona, Spain) according to manufacturer's instructions.

IgY purification

The separation of IgY from yolk was done using polyethylene glycol precipitation accordingly (Polson et al., 1985; Polson et al., 1980). One part of the egg yolk (10 mL) of the same immunized group of hens was briefly mixed with four parts (40 mL) of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5. Egg yolks were treated with 3.5% polyethylene glycol (PEG) 6000 by adding it to the egg yolks and incubated at room temperature for 20 minutes. This procedure was then followed by centrifugation at 5,000 x g for 25 minutes. After centrifugation, the precipitate was discarded. The supernatant phase was treated with 12% PEG 6000 and stirred then incubated for 10 minutes at room temperature, followed by a 25 minutes of centrifugation at 5,000 x g. The supernatant was discarded and the precipitate was dissolved in original volume of PBS and precipitated again with 12% of PEG 6000. The mixture was centrifuged once again as described above and the precipitate was dissolved in half the original yolk volume (5mL) of PBS.

Characterization of IgY by SDS- PAGE and Western blot

SDS-PAGE was performed using the Bio Rad® Mini gel system under reduced and denatured conditions. HAV virus was loaded into 12% of Bis-Tris gel and was run at 200 V for 40 minutes until the front dye reached the bottom of the gel casing. Gels were stained with Coomassie Blue stain to visualize proteins. Following SDS-PAGE, proteins were electrotransferred to nitrocellulose membrane in Western transfer buffer by running at 100 V for 120 min. The membrane was blocked in PBS-T 0.05% added to a solution of powder milk at 5% overnight at room temperature with agitation, then washed three times (5 min per wash) in PBS-Tween 0.05%. Membrane was incubated with IgY from each group (I-V) diluted 1:5000 in PBS-Tween 0.05%, in a solution of powder milk 5%, incubated at 37 °C for four hours with agitation. After incubation, the membrane was washed as described above. Afterwards, membrane was incubated at 37°C for 1 hour with rabbit IgG anti-IgY (Sigma, Steinheim-Germany) 1:5000 in PBS-T 0.05. The membrane was washed and incubated with A protein (Sigma, St Louis/USA) conjugated with diluted peroxides at 1:500 in PBS-T for 1 hour at 37 °C with agitation; followed by a final wash, three folds with PBS-T and three folds with PBS. HAV proteins bands were visualized using 5mg of 3,3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride in 20 μ L of peroxides, 100 micro litres of CoCl_2 in 10mL of PBS. The reaction was stopped by adding distilled water excessively.

Characterization of anti HAV IgY antibodies in yolk by enzyme-linked immunosorbent assay.

The IgY anti-HAV purified were serial diluted (1-10-fold) to evaluate the antibody activity and to compare the titration of antibodies levels using CPG-ODN as adjuvant. HAV specific IgY anti-HAV from immunized hens were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Biokit, Barcelona, Spain) according to manufacturer's instructions. Absorbance was recorded using an EIA plate reader. IgY from eggs collected from non immunized hens were used as a negative control.

***In vitro* neutralization of HAV by yolk IgY**

In order to evaluate antibody specificity an IgY-neutralizing to HAV assay was performed in cell culture. Briefly, serially diluted IgY (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, and 1:10000) were incubated with 10^5 copies/mL of HAV at 37°C for 1h. The inoculums which were previously adapted to FRHK-4 culture cell were added in FRHK-4 monolayer and maintained for 10 days at 37°C with 2% CO_2 . The replication of HAV was estimated by a quantified real time PCR technique for negative intermediate RNA detection as described previously by de Paula and cols. (de Paula et al., 2009).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows Inc. Data were reported as means $\pm$ standard deviation (SD) and levels of significance were evaluated using ANOVA. Differences were considered significant at level of $p < 0.05$.

Results

Effects of immunization in biology of chicken:

All immunized chickens showed a healthy clinical condition all throughout the experiment. The injection sites were painless, with no discomfort to the animals or tissue damage. In order to investigate the toxic or stress influence of adjuvant used in immunization, the weight gain was followed and compared among each group during the experiment. No abnormalities were observed in the development of hens during the immunization period (Table 1). The most common feature observed in all studied groups was a sub clinical fatty degeneration determined loss in the liver architecture; some areas of hepatic congestion were also detected. In the spleen, congestion was the main change detected in all groups. Kidneys sections presented normal architecture.

Characterization of specific anti-HAV IgY in sera and yolks:

In comparative analysis of serum titer of anti-HAV IgY amongst different immunization groups, we have detected the highest antibody titers in groups III and IV, 30 days after first immunization ($p < 0.001$) corresponding the animals' 7 weeks of age. In the second and third following months, post immunization none statistical differences were detected among groups (Figure 1). When anti-HAV IgY were titrated in yolk from each group, group III also showed high titer of IgY anti-HAV (Figure 2). However, no significant difference was observed among groups ($p > 0.05$). The hens started the egg laying period at 15 weeks old (30 days after the third immunization), all 1406 eggs were collected for 16 weeks. After protein extraction by polyethylene glycol 6000 precipitation, the total protein concentration was measured per group, the mean yield of yolk was 22,616 mg. For effective isolation SDS-PAGE was applied and purification of IgY from eggs was carried out (Figure 3). The electrophoretic pattern of gel filtration found was in accordance with the standard IgY; two heavy chains of 68 kDa and two light chains of 27 KDa. The presence of IgY anti-HAV in egg yolk was confirmed by Western Blotting (Figure 4) and ELISA. The groups I e III, that were inoculated with CPG-ODN, showed the stronger bands in western blotting. The IgY obtained from hens with and without HAV immunization were tested by ELISA to

quantify the specific anti-HAV in egg yolks. ELISA titers ranged from 10^1 to 10^4 according to the group; group III, that was immunized with CPG-ODN, HAV, IFA showed high anti-HAV IgY titers in egg yolks of 23 to 31 week olds.

To confirm the specificity and the skill of anti-HAV IgY in blocking the HAV penetration in FRhK-4 cells, we performed an *in vitro* neutralization assay using the HAV. Our results indicated that yolk antibodies were effective; neutralizing the virus until 1:100 dilutions. A small amount of HAV replication began at 1:1000 dilutions as described in table 2.

Discussion

The production of antibodies against HAV plays an important role in diagnosis and post-exposure prophylaxis; often these functions require large amounts of antibodies. The immunoglobulin against HAV used in diagnosis assay are mainly polyclonal antibody derived from human plasma or hybridoma from mice, which led to limited supply and possible health risks due to its impurity and undesirable cross reactions. In addition, the production of IgG in other non-rodent animals is limited by the low antibody yield that turns the HAV antibody production a very expensive procedure. In our study we obtained 1406 eggs in 16 weeks, with average protein concentration of 22,616 mg/mL. Previous studies reported that the content of total IgY in the egg yolk is relatively constant, with an average of 0.6%, wt/wt, among the chickens regardless of breed, egg weight, egg production or experimental period (Li et al., 1998) and a similar trend has been reported previously in the concentration of egg yolk IgY during immunization of chickens (Shimizu et al., 1988; Sunwoo et al., 1996). The beginning of the egg laying period which happened at the 15th week was associated with an absence of specific relevant clinical abnormalities and normal growth curves of hens despite liver fatty degeneration. The steatohepatitis has been considered an effect of rich fat diet (Ayala et al., 2009).

In this study, yield of IgY anti-HAV production was evaluated based on HAV immunization of hens with different protocols. In order to avoid a lower production of eggs after each immunization due to the stress caused by it (Levesque et al., 2007), the first immunization occurred when hens were 03 weeks old, and the last one happened 30 days

before the egg laying period. At the 15th week low titers of IgY anti-HAV was observed in yolks (figure 2). This fact suggests that titers of IgY anti-HAV are transferred slowly from serum to yolk with highest titer at 23rd week old (Figure 2) as previously described (Loeken and Roth, 1983). Hens which were immunized with HAV plus IFA with/or without CPG-ODN exhibited faster serological immune response to HAV just after the first immunization. After the second immunization, all groups were seroconverted. Interestingly, when the IgY anti-HAV were amounted in yolks, birds of group III showed an early transference of IgY anti-HAV to yolk (first week after first oviposition – 15 weeks old). Groups immunized with commercial vaccine with or without CPG-ODN (group I and II) also reached a high titer at 15 weeks old, this fact confirms that commercial vaccines may be useful to production of IgY anti-HAV.

The specificity of IgY to hepatitis A virus was confirmed by ELISA and Western blotting. The electrophoretic pattern of gel filtration was in accordance with the standard IgY (Devi et al., 2002). Although the antibodies titers are variable according to formulation of the inoculums used for each immunization, the amounts of antibodies produced were consistently high. Each group (four hens each) laid approximately 280 eggs in four months and a single egg yolk contains 100–150 mg of IgY antibodies. This can result in 28–42 g of IgY per year per chicken (Mine and Kovacs-Nolan, 2002; Pauly et al., 2009). The antigen-specific IgY antibodies represented between 2 to 10% of the total IgY obtained (Schade et al., 1994). Results of specific anti-HAV IgY were pooled at each sampling time for each adjuvant system tested. Specific anti-HAV IgY in egg yolks was detected in the first laying week (at 15 week old) in immunized hens with HAV, IFA and CPG-ODN. In this group of hens, the anti-HAV IgY deposited in eggs reached a first peak at week 23 and stabilized for at least 31 weeks onwards. When IFA was supplemented with CpG-ODN, an increase greater than 10^2 in anti-HAV IgY levels was observed in all weeks, compared with the use of IFA and HAV. The mean specific anti-HAV IgY concentration was always higher from first week right until the end of the experiment when compared with eggs from the other groups. This difference was significant, ($P < 0.05$). High levels of specific anti-HAV found in yolk was obtained using this adjuvant mix, as previously described (Levesque et al., 2007). The yield of specific IgY increased over time, so that the antibody recovery remained high, even after prolonged immunization periods. Furthermore, the IgY showed neutralizing capacity when used to block the replication activity of the HAV *in vitro*. These results show that IgY anti-HAV from egg

yolks could constitute a useful passive immunotherapy against hepatitis A since immunoglobulins seem to be effective for pre and post-exposure prophylaxis of hepatitis A (Liu et al., 2009)

In this study, we tried to enhance anti-HAV IgY immune response by co-administration of IFA with synthetic oligodeoxynucleotide. CpG ODN are synthetic agonists of Toll-like receptor 9 and potent inducers of innate and acquired immunity (Vincent et al., 2009). It has been shown that CpG-ODN can function as an effective adjuvant for vaccines against a variety of pathogens such as bacteria, viruses, fungi and parasites (Davis et al., 1998; Eastcott et al., 2001; Mahmood et al., 2006; Moldoveanu et al., 1998; Wu et al., 2009). As for HAV, CpG-ODN has been found beneficial to increase the immunogenicity of inactivated HAV vaccine and virus. In this report, we found that the addition of CpG-ODN as adjuvant was able to enhance IgY-specific immunity in hens, indicated by elevated IgG antibody titers in serum and yolk eggs. The antibodies induced by HAV or vaccine in different adjuvants were measured by ELISA. The addition of CpG-ODN as shown in figures 1 and 2, significantly enhanced anti-HAV IgY. With regards to animal protection regulations, the immunization of hens offered such advantages: the immunization with CPG-ODN as adjuvant was well tolerated. Collecting eggs, in contrast to bleeding animals, is a non-invasive procedure (Gassmann et al., 1990), which confirms the use of hens as an ethical alternative method for the production of anti-HAV specific antibodies; yet a simple and economical isolation process that can produce a large yield and of scalable production. In summary, we have successfully enhanced the production of IgY anti-HAV using CPG-ODN and IFA as adjuvants. This immunoglobulin can be used in the future as a novel tool for research, diagnosis and therapy for hepatitis A. The anti-HAV production in yolk would represent an ethical methodology to substitute mammalian anti-HAV on a large-scale production.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Edital Universal 15/2007 – Grant 476808/2007-3) and Fundação Oswaldo Cruz - PAPES V. Alexandre dos Santos da Silva and Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos are MSc. students at Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Both hold

scholarships from CNPq. Livia Abud Kappel has a scholarship from Faperj (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro). The authors also thank Dr. Christian Niel for revision and criticism of the manuscript and Claudia Kamel for helping with the translation.

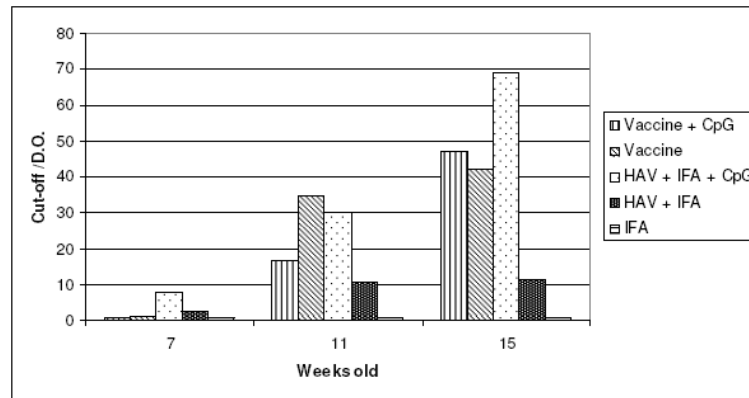


Fig 1. Antibodies responses in differently immunized groups. Each bar in the graph is the average IgY anti-HAV in serum of four hens. Immunizations carried out with the same antigen were performed with an interval of 4 weeks under identical conditions. The figure shows a distinct difference in concentration, the HAV, IFA, CPG-ODN treated group showed anti-HAV after the first inoculation.

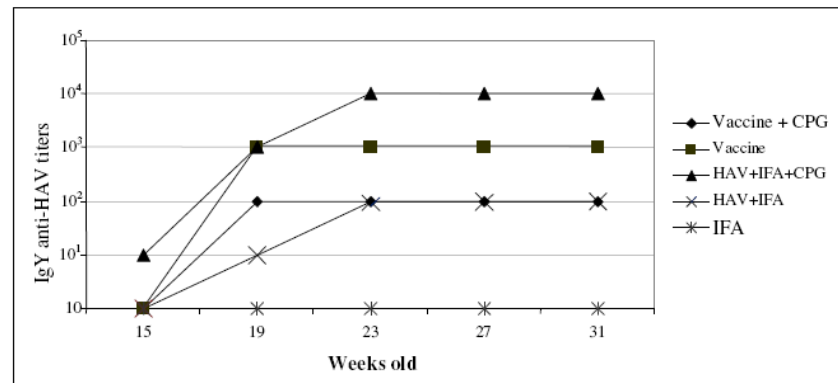


Fig 2. Immunospecific anti-HAV IgY titer in egg yolk of each immunized hengroup. Each point represents the week that eggs were collected. Titers were measured using ELISA. In IgY isolated from non immunized hens anti-HAV were not detected.

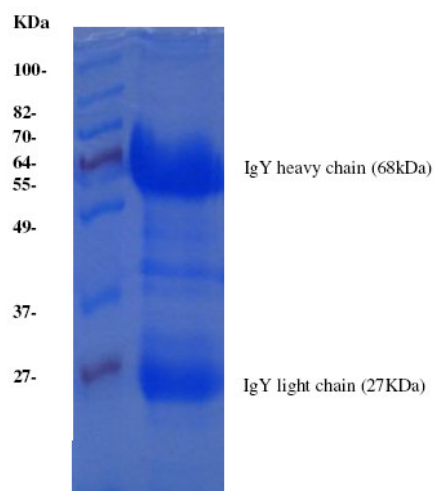


Figure 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of purified immunoglobulin (IgY) from egg yolk. The acrylamide concentration was 12%. Lane 1 - molecular weight, lane 2 -IgY.

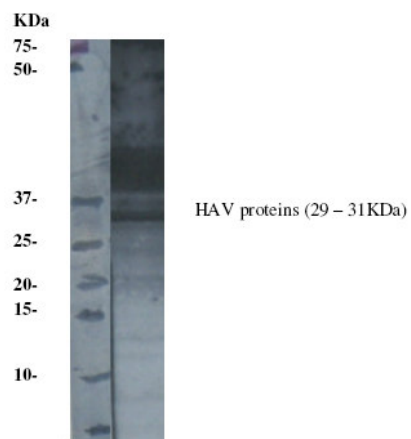


Figure 4. Western Blot analysis of IgY anti-HAV. The hepatitis A virus was incubated IgY anti-HAV. HAV was vincubated with igY anti-HAV. Lane 1 –Molecular weight lane 2 – HAV proteins.

Table 1. Average of body weight of hens before inoculations.

	Mean body weight g ($\pm$ SD)		
	1 st inoculation	2 nd inoculation	3 rd inoculation
Vaccine + CpG-ODN	184.75 (20.4)	682.50 (33.7)	1,430.00(92.0)
Vaccine	181.25(26.8)	670.00(63.7)	1,508.33(135.3)
HAV + IFA + CpG-ODN	161.00(05.9)	638.75(77.9)	1,462.50(108.0)
HAV + IFA	174.5(26.6)	583.75(87.2)	1,333.75(176.0)
IFA	165.5(03.7)	616.6(55.3)	1,193.33(66.5)

Table 2 – Neutralization test of HAV with anti-HAV IgY and numbers of copies of HAV replicative detected.

IgY dilution	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	Without IgY
Neutralization titer	1:1	1:10	1:100	0	0	-
HAV copies/mL	ND	ND	ND	2.26	65.48	5.8×10^5

ND = not determined

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)