

Fundação Oswaldo cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da hepatite A utilizando IgY anti-HAV

por

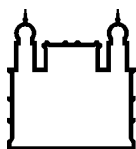
Alexandre dos Santos da Silva

Rio de Janeiro
Março de 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

ALEXANDRE DOS SANTOS DA SILVA

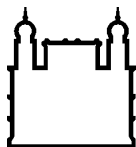
**Ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da
hepatite A utilizando IgY anti-HAV**

Dissertação apresentada à coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Orientador (es): Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Março de 2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ALEXANDRE DOS SANTOS DA SILVA

Ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da hepatite A utilizando IgY anti-HAV

ORIENTADOR: Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: 29/03/2010

EXAMINADORES:

Dra Livia Melo Villar - Presidente

Dra. Flavia Barreto dos Santos

Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro

Dra. Natalia Motta de Araujo

Dr. Adilson José de Almeida

Rio de Janeiro, 29 de Março de 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia – Departamento de Virologia – IOC/FIOCRUZ – Rio de Janeiro/RJ sob orientação da Dra Vanessa Salete de Paula.

O trabalho científico foi meu principal prazer e minha única ocupação durante a vida; e a animação proveniente desse trabalho faz-me esquecer momentaneamente, ou afasta por completo, meu mal-estar cotidiano

Charles Darwin

O que faz de um pesquisador um ótimo pesquisador é a incrível capacidade de persistir e ter paciência

Autor desconhecido

Esse trabalho é dedicado a minha amiga, confidente, conselheira e esposa Taís, por todo amor e amizade que me dedica, por toda a força que me dá e todo apoio que me presta, sem você eu não teria chegado até esse ponto. Sem você eu já teria desistido há muito tempo. Essas frases não demonstram o quanto lhe devo e é apenas uma parte do quanto te amo.

Agradecimentos

- À minha orientadora Dra. Vanessa Salete de Paula por puxar minha orelha sempre que necessário, o que foi muitas vezes, e por me dar os conselhos mais do que necessários para me tornar um bom pesquisador, o que eu espero que um dia irei conseguir e que estará ao meu lado me ajudando nos próximos passos.
- Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar e Jaqueline Mendes de Oliveira pela colaboração nessa dissertação.
- Aos meus colegas de laboratório: Gentil que me ajudou em boa parte do trabalho, Juliana e Amanda que por mais que tivéssemos problemas no mestrado, sempre riamos da vida. Agradeço, à Renata, Lilian, Tamara, Carol, Paula, Débora, Luciane, Daniela e Alyne pela amizade, ajuda e companheirismo dentro do laboratório.
- Aos Laboratórios de Virologia Molecular e Hepatites virais por sua colaboração.
- Ao programa de pós-graduação em Biologia Parasitaria do Instituto Oswaldo cruz-Fiocruz por me proporcionar o curso de mestrado em Biologia Parasitaria.
- Ao CNPq pela bolsa de mestrado e aos projetos aprovados que proporcionaram a realização deste trabalho.
- Aos pesquisadores Dra. Flavia Barreto dos Santos, Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro, Dra. Natalia Motta de Araujo e ao Dr. Adilson José de Almeida por terem aceito o convite para serem membros da banca avaliadora e à Dra. Livia Melo Villar pela revisão da dissertação.
- À minha família, que acredita em mim e no meu trabalho futuro e em que um dia eu ajudarei muita gente. Dentre eles: às minhas tias, aos meus tios, à minha tia Aninha que torce por mim e fica feliz em dizer que o sobrinho dela é um pesquisador e aos meus primos que nunca se desgrudam. Agradeço muito à minha avó Glória que todo dia me demonstra o que é a sabedoria e a vontade de viver, que ama toda a sua família e é uma das melhores pessoas que eu já conheci na vida. Agradeço aos meu irmão Tairon (que adora fazer experimentos comigo), à minha irmã Tauanny e a meu irmão André que do jeito dele sempre torceu por mim junto com a minha cunhada Gleice. Agradeço aos

meus dois sobrinhos, Mateus e João Pedro, por me lembrarem o que é ser criança e rirem de toda palhaçada que eu faço. Agradeço à minha mãe que sempre se esforçou para os filhos deles crescerem e se tornarem homens honestos e decentes e a meu pai que mesmo de longe tentava dar conselhos e ajudar seus filhos e mesmo tentando esconder sempre se orgulhou de nós.

- Aos meus colegas do curso de pós-graduação em Biologia Parasitaria pela ajuda e companheirismo.

- Agradeço tanto aos meus amigos que me apoiaram nessa jornada, quanto os que acham que é perda de tempo. Os dois tipos me forçaram a chegar até aqui. Dentre estes eu posso citar meus amigos do Leme (sempre perguntando se eu já curei o Câncer), meus amigos de Copacabana que mesmo se vendo pouco, parece que temos 13 anos de novo, meus amigos da Federal de Química que estão comigo até hoje mesmo depois de dez anos e vão ficar por muito tempo e meus amigos da faculdade, que hoje em dia são mestres e futuros doutores, e que eu não poderia ter escolhido melhor para ter passado pela difícil empreitada de ser biólogo. Não citarei o nome de nenhum amigo para não pecar e esquecer o nome de algum.

- À minha esposa que me dá apoio e força para continuar seguindo em frente e que é a minha alegria desde o momento em que acordo até o momento que eu durmo, suas palhaçadas, conselhos e carinhos sempre me fazem sentir melhor, mais feliz e esquecer os problemas desta vida.

Lista de Quadros

Quadro 1.1: Dosagem recomendada da vacina de hepatite A e esquema de vacinação por faixa etária.....	12
Quadro 1.2: Grupos expostos a risco para a transmissão de hepatite A.....	14
Quadro 1.3: Características estruturais, físico-químicas e imunológicas das imunoglobulinas IgY e IgG.....	20
Quadro 3.1: Inoculações ocorridas por grupo	35
Quadro 4.1: Média do peso das galinhas e do desvio padrão por grupos....	49
Quadro 4.2: Número de ovos coletados por semana.....	52
Quadro 4.3: Teste de neutralização de HAV com IgY anti-HAV e número de cópias do HAV replicativo detectado.....	55
Quadro 4.4: Valores dos parâmetros de validação do teste imunoenzimático utilizando IgY anti-HAV.....	60

Lista de Figuras

Figura 1.1: Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A.....	3
Figura 1.2: Eventos imunológicos, bioquímicos e virológicos durante uma infecção por HAV.....	6
Figura 1.3: Distribuição geográfica da prevalência de anticorpos anti-HAV distribuídos por padrões de infecção.....	16
Figura 1.4: Comparação da estrutura molecular entre a IgG dos mamíferos e IgY das galinhas.....	22
Figura 3.1: Acondicionamento das galinhas.....	34
Figura 3.2: Esquema da imunização das galinhas.....	34
Figura 3.3: Linha do tempo da imunização e postura dos ovos das frangas poedeiras.....	36
Figura 3.4: Coleta do Sangue das frangas poedeiras.....	36
Figura 3.5: Esquema da purificação da imunoglobulina Y utilizando o método de Polson de 1985.....	37
Figura 3.6: Esquema da conjugação da imunoglobulina Y com a peroxidase.....	39
Figura 4.1: Gel de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE) da imunoglobulina purificada da gema dos ovos (IgY).....	54
Figura 4.2: Análise do Western Blotting do IgY anti-HAV.....	55
Figura 4.3: Avaliação da melhor diluição do conjugado em um teste de IgY anti-HAV utilizando o IgY de captura em uma diluição de 1:1000.....	57
Figura 4.4: Padronização do ensaio imunoenzimático competitivo “in-house” IgY anti-HAV.....	58
Figura 4.5: Padronização do ensaio imunoenzimático competitivo “in-house” IgY anti-HAV com a etapa de bloqueio.....	59
Figura 4.6: Curva ROC demonstrando a especificidade e sensibilidade do ensaio imunoenzimático “in-house” IgY anti-HAV.....	61

Lista de Gráficos

Gráfico 4.1: Peso (g) das galinhas dos cinco grupos em cada pesagem. As pesagens foram realizadas a cada mês após a 1 ^a imunização.....	50
Gráfico 4.2: Resposta de anticorpos IgY nos diferentes grupos de galinhas imunizadas.....	51
Gráfico 4.3. Média da concentração de IgY (mg/mL) encontrada em ovos das galinhas imunizadas.....	52
Gráfico 4.4: Títulos de IgY anti-HAV encontrados nas semanas 1, 5, 9, 13 e 16 após a postura dos ovos das galinhas imunizadas.....	53

Abreviaturas

u(Δ Fc) = cadeia pesada do IgY truncado

3' RNC = região 3' não codificante

5' RNC = região 5' não-codificante

ALT = alanina aminotransferase

Anti-HAV = anticorpos contra o vírus da Hepatite A

Anti-HAV IgM = anticorpos IgM contra o vírus da Hepatite A

Anti-HCV = anticorpos contra o vírus da Hepatite C

AST = aspartato transferase

CpG-ODN = adjuvante oligodesoxinucleotideo CpG

dNTP = desoxirribunucleotídeos trifosfatos

DTT = Dithiotreitol

EIE = ensaios imunoenzimáticos

FRhK-4 = células de rim fetal de macaco Rhesus tratadas para cultura do vírus da Hepatite A

H₂SO₄ = Ácido sulfúrico

HAV = vírus da Hepatite A

HBsAg = antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

IFA = Adjuvante Incompleto de Freund

Ig = Imunoglobulina

IgA = imunoglobulina A

IgG = imunoglobulina G

IgG anti-HAV = anticorpos IgG contra o vírus da Hepatite A

IgIM = Imunoglobulina intramuscular convencional

IgM= imunoglobulina M

IgM anti-HBC = anticorpos IgM contra vírus da Hepatite B

IgY = imunoglobulina Y

IgY(Δ Fc) = IgY truncado

MMLV-RT = do inglês “Moloney murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase”

ORF = Fase de leitura aberta

PBST = PBS-TWEEN

PCR = reação em cadeia de polimerase

RNAsin = inibidor de RNA

RT-PCR= PCR em tempo real

Resumo

A hepatite A é uma doença endêmica no Brasil e na América Latina. A prevalência da infecção tem correlação com precárias condições de higiene e saneamento. Em países em desenvolvimento, um saneamento inadequado resulta em maior transmissão desta doença, principalmente entre crianças e jovens. Atualmente, devido às melhorias das condições sanitárias, o perfil epidemiológico da doença está se deslocando para idades mais avançadas, o que facilita a ocorrência de surtos epidemiológicos. Os kits comerciais para detecção de anti-HAV total normalmente utilizam imunoglobulina G (IgG) de mamíferos no período convalescente da doença para a produção dos anticorpos de captura e do conjugado. Uma alternativa à aplicação dos anticorpos de mamíferos no diagnóstico é o uso da imunoglobulina Y (IgY), encontrada no soro e gema dos ovos de aves e répteis. Essas proteínas têm várias vantagens quando comparadas com IgG: alta resposta contra antígenos de mamíferos, redução da cor de fundo em ensaios imunoenzimáticos e de serem obtidas por um método não-invasivo (coleta da gema dos ovos). O objetivo deste trabalho foi a obtenção de anticorpos IgY anti-HAV produzidos em galinhas imunizadas contra o vírus da Hepatite A (HAV) e o desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de anti-HAV total utilizando IgY anti-HAV como imunoglobulinas de captura e conjugado. Cinco grupos de galinhas foram imunizadas com diferentes inóculos contendo: vacina com e sem o adjuvante CpG-ODN, HAV com adjuvante incompleto de Freund (IFA) com e sem o adjuvante CpG-ODN e um grupo controle com IFA. Os ovos foram coletados e a gema foi purificada pela precipitação com polietileno glicol. A solução purificada contendo IgY anti-HAV foi avaliada para determinação da concentração da IgY anti-HAV por espectrofotometria e sua especificidade e título foram determinados à partir de um teste imunoenzimático. Os anticorpos foram conjugados com a peroxidase e foi estabelecida a diluição ideal para os anticorpos de captura e conjugado. Para avaliar o ensaio imunoenzimático “in-house” com IgY anti-HAV, foi avaliado um painel composto de 100 amostras positivas e 100 amostras negativas para anti-HAV-total. A presença da IgY anti-HAV nas gemas dos ovos foi confirmada por SDS-PAGE e Western Blotting, e após a purificação, a média da concentração de proteínas nas gemas dos ovos foi de 8,7406 mg /mL. O grupo imunizado com HAV, IFA e CPG-ODN apresentou os maiores títulos de anticorpo. O ensaio “in-house” apresentou sensibilidade de 84%, especificidade de 79% e eficiência de 81,5%. Os métodos utilizados para a produção de IgY anti-HAV e sua conjugação com peroxidase foram eficientes e o ensaio imunoenzimático “in-house” IgY anti-HAV demonstrou uma boa sensibilidade e especificidade. A produção de anti-HAV IgY apresenta vantagens quando comparado com obtenção da IgG anti-HAV. O teste imunoenzimático “in house” com IgY anti-HAV pode ser uma alternativa a utilização da IgG nos ensaios imunoenzimáticos.

Palavras-chaves: IgY, ensaio imunoenzimático, hepatite A, CpG-ODN

Abstract

Hepatitis A is an endemic disease in Brazil and Latin America. Prevalence of this infection is related to the low degree of hygiene and sanitation. In developing countries, inadequate sanitation results in larger transmission of the disease mostly in children and young people. Nowadays, due to better sanitation conditions, the epidemiological profile of disease is changing to older ages resulting in the occurrence of outbreaks. Diagnostic kits for detection of total anti-HAV generally use mammals immunoglobulin G (IgG) in the convalescent period of disease for production of capture and conjugated antibodies. One alternative to the application of mammals antibodies in the diagnosis is the use of immunoglobulin Y (IgY), encountered in birds and reptiles. These proteins have several advantages when compared to IgG: high response against mammals antigens, reduction of the background in immunoenzymatic assays and it is obtained by a non-invasive method (harvest of the egg yolks). The objective of this work was the acquisition of anti-HAV IgY antibodies produced in immunized chickens against Hepatitis A virus and the development of an immunoenzymatic assay for total anti-HAV detection using IgY anti-HAV as capture and conjugated immunoglobulins. Five groups of chickens were immunized with different inocula containing: vaccine with and without CpG-ODN adjuvant, HAV with incomplete Freund adjuvant (IFA) with and without CpG-ODN and one control group with IFA. The eggs were harvested and the yolk was purified by precipitation with polyethylene glycol. The purified solution containing anti-HAV IgY was evaluated by espectrofotometry and their specificity and title were determined by an immunoenzymatic assay. These antibodies were conjugated with peroxidase and was estabilized the ideal dilution for capture and conjugated antibodies. For evaluation of the immunoenzymatic “in-house” assay with IgY anti-HAV, a panel composed of 100 positive samples and 100 negative samples for total anti-HAV was assessed. The presence of IgY anti-HAV in egg yolks was established by SDS-PAGE and Western Blotting, and after the purification, the average of the proteins concentrations in the egg yolks was of 8,7406 mg/mL. The group immunized with HAV, IFA and CpG-ODN demonstrate the higher titer of antibodies. The “in-house” assay showed sensibility of 84%, specificity of 79% and efficiency of 81,5%. The methods used for anti-HAV IgY production and conjugation with peroxidase were efficient and the “in-house” immunoenzymatic assay IgY anti-HAV demonstrated a good sensitivity and specificity. The production of IgY anti-HAV showed advantages when compared to the acquisition of IgG anti-HAV. The immunoenzymatic “in-house” assay IgY anti-HAV can be an alternative to the utilization of IgG in immunoenzymatic assays.

Key-Words: IgY, immunoenzymatic assay, hepatitis A, CpG-ODN

Sumário

Lista de quadros.....	IX
Lista de figuras.....	X
Lista de gráficos.....	XI
 Abreviaturas.....	 XII
 RESUMO.....	 Xlv
 ABSTRACT.....	 xv
 1.INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Histórico da Hepatite A.....	1
1.2. Vírus da Hepatite A.....	2
1.3. Genoma viral.....	3
1.4. Replicação viral.....	5
1.5. Patogênese.....	5
1.6. Formas Clínicas.....	7
1.7. Diagnóstico laboratorial.....	9
1.8. Prevenção e profilaxia.....	10
1.9. Epidemiologia.....	13
1.10. Histórico da Imunoglobulina Y.....	17
1.11. Imunoglobulina Y.....	18
1.12. Estrutura molecular da Imunoglobulina Y.....	22
1.13. CpG-ODN.....	24
1.14. Relevância da utilização da IgY no diagnóstico da Hepatite A.....	25
 2. OBJETIVOS.....	 26

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Parecer do Conselho de Ética para a utilização de galinhas.....	27
3.2. Utilização das amostras de sangue.....	27
3.3. Produção do vírus da Hepatite A.....	27
3.3.1. Propagação das células FRHK4.....	27
3.3.2. Propagação e liberação do vírus da Hepatite A.....	28
3.4. Detecção e Quantificação das partículas virais produzidas.....	29
3.4.1. Extração do RNA do vírus HAV em amostras de células FRHK4	29
3.4.2. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	31
3.4.3. PCR qualitativo e Eletroforese em gel de agarose.....	31
3.4.4. Quantificação de partículas virais.....	32
3.5. Utilização das galinhas.....	33
3.6. Imunização das galinhas poedeiras.....	34
3.7. Purificação da Imunoglobulina Y.....	36
3.8. Produção do conjugado anti HAV.....	38
3.9. Caracterização da IgY por SDS-PAGE e Western Blotting.....	40
3.9.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
3.9.2. Western Blotting.....	41
3.10. Neutralização <i>In vitro</i> do HAV pela IgY anti-HAV.....	42
3.11. Avaliação da IgY anti-HAV como conjugado e captura.....	43
3.12. Padronização do teste para detecção de imunoglobulinas totais anti-HAV.....	44
3.13. População de estudo.....	46
3.14. Detecção de anticorpos anti-HAV totais utilizando IgY como captura e conjugado.....	46
3.15. Análise estatística.....	46
4.RESULTADOS.....	49
4.1. Propagação e Quantificação das partículas virais.....	49
4.2. Efeitos da imunização nas galinhas.....	49
4.3. Avaliação da IgY anti-HAV purificada das gemas dos ovos.....	51

4.4.	Eletroforese.....	53
4.5.	Western Blotting.....	54
4.6.	Neutralização <i>In vitro</i> da hepatite A pela IgY.....	55
4.7.	Avaliação da IgY como conjugado e captura.....	56
4.8.	Padronização do teste para detecção de imunoglobulinas totais anti-HAV.....	57
4.9.	Detecção de anticorpos anti-HAV totais utilizando IgY como captura e conjugado.....	59
5.	DISCUSSÃO.....	62
5.1.	Produção de IgY anti-HAV.....	62
5.2.	Padronização e avaliação do teste imunoenzimático de ELISA utilizando IgY anti-HAV como conjugado e captura.....	66
6.	CONCLUSÃO.....	70
.		
	BIBLIOGRAFIA.....	71

1. Introdução

1.1 Histórico da Hepatite A

Antigos textos chineses do século VIII depois de Cristo já faziam referência à existência de icterícia (Zuckerman, 1983). No entanto, somente a partir do século XVII, freqüentemente começa a se perceber a ocorrência de surtos de icterícia. Era comum ocorrer a presença de icterícia em militares e, por isso, a doença foi chamada de icterícia de campanha. O primeiro relato escrito da doença ocorreu em 1912 com a descrição de uma epidemia na ilha de Minorca, Espanha, em 1745 (Cockayne, 1912).

McDonald (Mcdonald, 1908) foi o primeiro a associar a icterícia com a presença de um vírus no fígado. Em 1923, Blummer demonstrou o padrão da doença em epidemias ocorridas nos Estados Unidos entre os anos de 1812 a 1922 (Blumer, 1923). Comprovando a existência de uma das formas de hepatites virais, que passou a ser chamada de hepatite viral do tipo A.

Estudos epidemiológicos e experimentos em voluntários humanos ocorreram no período da Segunda Guerra Mundial. A transmissão da doença de pessoa-a-pessoa foi demonstrada na Alemanha em 1942 (Voegt, 1942), no Oriente Médio em 1943 (Cameron, 1943) e nos Estados Unidos em 1944 (MacCallum *et al.*, 1944). Em 1947 foram introduzidos os termos da Hepatite A e Hepatite B, que passaram a ser adotados pela Organização Mundial de Saúde no lugar das várias descrições anteriormente aplicadas (MacCallum, 1947).

Entre as décadas de 1950 a 1970, Krugman (Krugman *et al.*, 1967) e Murray (Murray, 1955) definiram as relações soropidemiológicas entre a hepatite A e hepatite B. Estudos do grupo de Krugman permitiram diferenciar dois tipos distintos de hepatites em uma escola para excepcionais. Um dos agentes causadores de hepatite designado MS-1 era transmitido primariamente pela via fecal-oral, mas poderia ser transmitido pela inoculação de sangue durante o estado de viremia. A doença era altamente infecciosa, tinha um período de incubação curto e parecia bastante com a Hepatite A clássica. A

cepa MS-1 do vírus de hepatite A foi utilizada para infectar voluntários adultos (Boggs *et al.*, 1970), levando à identificação do vírus nas suas fezes por microscopia eletrônica em 1973 (Feinstone *et al.*, 1973). Ensaios imunoenzimáticos foram posteriormente desenvolvidos para detectar o antígeno e seu anticorpo. Em 1979, a adaptação do vírus em cultura celular foi um sucesso, possibilitando o desenvolvimento de kits para diagnóstico e vacinas (Provost *et al.*, 1986).

1.2. Vírus da Hepatite A

No começo dos anos 80, de acordo com suas características biofísicas e bioquímicas, o HAV foi classificado como enterovírus do tipo 72 da família *Picornaviridae*. Essa classificação ocorreu por sua semelhança com os enterovírus e cardiovírus (Gust *et al.*, 1983, Melnick, 1982). Em relação aos outros participantes da família *Picornaviridae*, o HAV tem as seguintes particularidades: seqüências nucleotídicas e aminoácidas diferentes de outros participantes dessa família, proteínas com tamanhos diferentes dos outros *Picornaviridae*, resistência a temperaturas e drogas que inativam outros picornavírus, replicação lenta e sem efeito citopático em culturas celulares, estabilidade em pH 1, existência de apenas um sorotipo e ausência de reação com anticorpos anti-enterovirus (Yousef *et al.*, 1987). Tais diferenciações colocaram o HAV em um novo gênero viral dentro da família *Picornaviridae*, o gênero *Hepatovírus*, sendo este o único exemplar do gênero. Fenotipicamente o HAV apresenta um diâmetro de 27 a 32 nm, é um vírus não-envelopado e icosaédrico (Feinstone *et al.*, 1973) (figura 1.1).

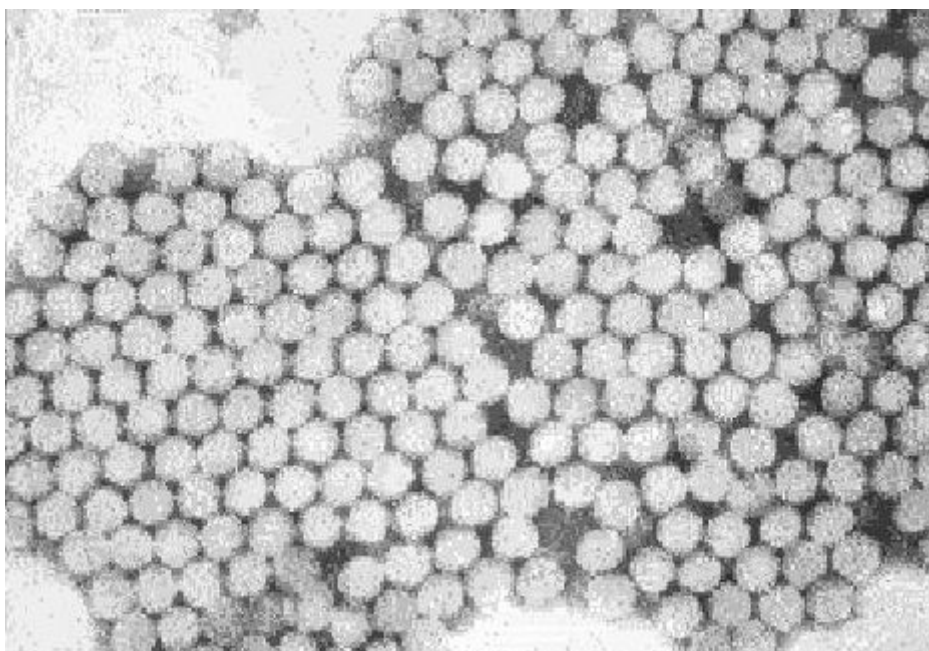


Figura 1.1: Imunomicroscopia eletrônica do vírus da Hepatite A (fonte: CDC, 2009 <http://WWW.cdc.gov>)

1.3. Genoma viral

O virion é composto de um RNA com genoma linear, de polaridade positiva e fita-simples, com aproximadamente 7.5 kilobases (kb) seguido por uma cauda poliadenilada de 40 a 80 nucleotídeos de comprimento (Koff, 1998, Paul *et al.*, 1987, Provost *et al.*, 1986) e um capsídeo contendo 60 cópias das proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 (Martin *et al.*, 2006). O genoma do HAV é compreendido por uma região 5' não-codificante (5' RNC) que compreende aproximadamente a 10% do genoma, não é encapsidado e está covalentemente ligado a uma proteína viral de VPg (ou 3B) (Weitz *et al.*, 1986) de 2.5 kd na porção 5' terminal. Ele também apresenta uma única fase de leitura aberta (ORF) que codifica as proteínas virais estruturais (P1) e não estruturais (P2 e P3), além de uma pequena região 3' não codificante (3' RNC) que termina em uma cauda poliadenilada (Koff, 1998).

A região 5' RNC é a região mais conservada do genoma com identidade nucleotídica acima de 89% entre as cepas dos genótipos I, II e III (Brown *et al.*, 1991), ela possui 734 nucleotídeos e precede a sua ORF e a região 3' RNC. A

proteína viral VPg (ou 3B) covalentemente ligada a essa região é organizada em estruturas secundárias e terciárias, sendo seis domínios de estruturas secundárias, dentre eles um grampo, duas estruturas helicoidais e um trato de polipirimidina (Cohen *et al.*, 1987). Entre os nucleotídeos 1-95 se encontram os dois primeiros domínios, que atuam no controle da iniciação da síntese da fita positiva de RNA (Andino *et al.*, 1993). Os quatro domínios restantes estão localizados entre os nucleotídeos 155-734, dentre esses, o terceiro domínio parece participar na replicação do RNA viral e o último domínio atua como sítio de entrada interno no ribossomo (IRES), o qual direciona a tradução da ORF (Andino *et al.* 1993).

A região 3' RNC possui mais de 20% de heterogeneidade entre as cepas de HAV, por isso é mais variável quando comparada com a região 5' RNC, ela tem 60 nucleotídeos e é poliadenilada em sua extremidade 3'. Além disso, apresenta estruturas secundárias helicoidais e possivelmente um pseudo-nó. Provavelmente estas estruturas são responsáveis pela interação entre as proteínas virais e celulares específicas e também são importantes na síntese do RNA viral (Nuesch *et al.*, 1993).

A região de leitura aberta do HAV é traduzida em um longo precursor polipeptídico (com 6681 bases), que é processado por uma cascata de clivagens produtoras das proteínas virais maduras (Palmenberg, 1990). Esse precursor polipeptídico compreende três regiões: a região P1 (que codifica as proteínas estruturais VP4, VP2, VP3 e VP1), a região P2 (que codifica as proteínas 2A, 2B e 2C não estruturais) e a região P3 (que codifica as proteínas 3A, 3B ou VPg que é ligada covalentemente ao RNA do HAV podendo fazer o papel de iniciador (Weitz *et al.*, 1986) e as proteínas 3C e 3D que são não estruturais).

Inicialmente, a análise da região de junção VP1-2A de 152 isolados de HAV de diferentes partes do mundo resultou na designação de sete genótipos (com identidade seqüencial menor do que 85% entre genótipos e com menos de 15% de divergência dentro de um mesmo genótipo) denominados de I a VII (Robertson *et al.*, 1992). Uma análise adicional da região VP1 inteira indicou que os genótipos II e VII deveriam ser reclassificados dentro do genótipo II como subgenótipos A e B. Além disso, os genótipos I e III também foram subdivididos em subgenótipos A e B. Atualmente o HAV é classificado em seis

genótipos, sendo três humanos e três de primatas não humanos (Costa-Mattioli *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2004).

1.4. Replicação viral

A replicação viral ocorre no citoplasma e tem início com a adsorção do vírus à membrana celular. Com a penetração na célula hospedeira a partir dos receptores específicos denominados HAVcr-1 encontrados em células de rim de macaco verde africano (Kaplan *et al.*, 1996) e huHAV encontrados em células humanas (Feigelstock *et al.*, 1998), o vírus perde o capsídeo e libera o seu RNA, passando a funcionar como RNA mensageiro (RNAm) para a tradução da poliproteína. Após a descapsidação, o RNAm sintetiza a poliproteína, que é direcionada para a região do sítio de entrada interna ou IRES. A tradução se inicia com a ligação do IRES à subunidade 40S do ribossomo celular. O HAV então sintetiza uma cópia do RNA complementar de polaridade negativa (replicativo intermediário), que servirá de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva, fitas estas que produzirão novas proteínas virais. As regiões 5' e 3' terminais são importantes para a replicação, sendo necessárias para a iniciação da síntese das fitas de RNA, tanto positivas quanto negativas. As fitas positivas são sintetizadas dentro do retículo endoplasmático liso através de um processo catalisado pelas proteínas não-estruturais recém formadas. Além das fitas positivas, outras fitas negativas são rapidamente formadas no retículo endoplasmático liso, formando assim novas moléculas que poderão replicar novas fitas de RNA de polaridade positiva e que formarão novas proteínas virais. O ciclo replicativo termina com a montagem e brotamento da partícula viral. O capsídeo é montado em uma estrutura de icosaedro contendo 60 cópias de cada um dos três polipeptídeos formadores da partícula viral (Kusov *et al.*, 2005).

1.5. Patogênese

Normalmente a infecção natural pelo HAV se dá pela ingestão de fezes contaminadas pelo vírus. O vírus passa pelo estômago ou intestino onde é

absorvido, podendo chegar até os hepatócitos pela circulação sistêmica, nos quais ocorrerá sua replicação. Imunofluorescência nas células crípticas do trato intestinal sugere que a replicação pode ocorrer também no intestino (Asher *et al.*, 1995).

Quando chega aos hepatócitos, o vírus é capturado por seus receptores específicos. O vírus então se multiplica, é liberado da célula e eliminado através da membrana apical do hepatócito, produzindo assim a viremia. O HAV chega ao trato intestinal através da bile e deste modo é eliminado pelas fezes dos indivíduos infectados ao mesmo tempo em que ocorre a viremia. A viremia ocorre no período entre 1 a 2 semanas depois da exposição ao HAV e persiste por todo o período da elevação enzimática no fígado (Brundage *et al.*, 2006, Lemon, 1994, Margolis *et al.*, 1988, Nainan *et al.*, 2006). A infecciosidade das fezes começa na primeira semana após a infecção e vai diminuindo até chegar à quinta semana. O pico da infectividade, através da excreção fecal, ocorre antes do início dos sintomas ou da elevação do nível das enzimas hepáticas e declina após o aparecimento dos sintomas (Nainan *et al.*, 2006, Skinhoj *et al.*, 1981, Tassopoulos *et al.*, 1986) (Figura 1.2).

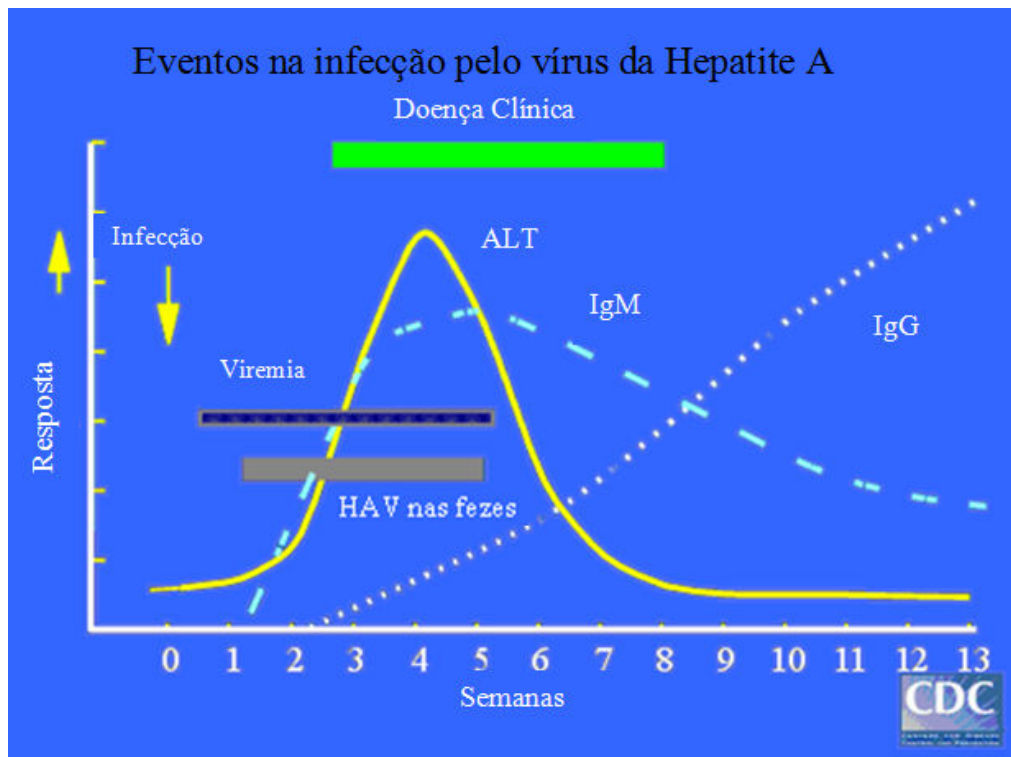


Figura 1.2. Eventos imunológicos, bioquímicos e virológicos durante uma infecção por HAV. (Fonte: Adaptado de CDC,2006)

A concentração do HAV no soro pode variar de 10^3 à 10^7 virions/mL, enquanto que nas fezes a quantidade é bem maior, de 10^9 virions/mL (Bower *et al.*, 2000, Cohen *et al.*, 1989, Sanchez *et al.*, 2006). Na saliva de um indivíduo infectado foi encontrado uma liberação viral de até 10^8 cópias/mL (Amado *et al.*, 2008).

A replicação ocorre nos hepatócitos e nas células do epitélio gastrointestinal (Brundage *et al.* 2006). Entretanto, a detecção do vírus nas tonsilas e saliva, logo após o aparecimento do vírus no sangue, sugere que um evento anterior de replicação pode ter ocorrido na orofaringe ou nas glândulas salivárias (Cohen *et al.*, 1989). Poucas evidências indicam uma correlação citotóxica entre o vírus da Hepatite A e os hepatócitos. Embora haja alguma correlação entre a severidade da doença e a excreção do vírus nas fezes, a excreção fecal, geralmente é maior antes do dano hepático, o que é demonstrado por uma elevação na alanina transferase (Frosner *et al.*, 1977).

A resposta humoral anti-HAV ocorre antes do aparecimento dos sintomas e consiste de anticorpos IgM, IgG e IgA. IgM anti-HAV é detectável quando os pacientes com Hepatite A se tornam sintomáticos. Seu título aumenta durante a infecção aguda e tipicamente desaparecem com 3 meses após o aparecimento inicial dos sintomas (Kiyohara *et al.*, 2009). Os anticorpos IgG e IgA aparecem 2 dias após o começo da doença clínica, sendo detectados por testes imunoenzimáticos (Lemon *et al.*, 1985, Stapleton, 1999). A resposta específica de IgM anti-HAV é limitada pela infecção inicial, exceto em casos raros e se transforma em um marcador útil da doença. Após o aparecimento do IgM, aparecem os anticorpos IgG, que conferem imunidade duradoura para uma reinfecção pelo HAV. A combinação de anticorpos anti-HAV IgM e anticorpos totais anti-HAV (IgG, IgM e IgA) diferencia a infecção atual e passada. Como o vírus também é encontrado em secreções como a saliva, anticorpos IgA anti-HAV são produzidos durante a infecção adulta e persistem por meses durante a fase de convalescença (Locarnini *et al.*, 1980).

1.6. Formas Clínicas

A Hepatite A tem uma manifestação clínica muito variável, indo desde infecções inaparentes ou assintomáticas, passando por infecções em pacientes

anictéricos, que desenvolvem os sintomas clínicos mas não possuem icterícia, até falência hepática (Hollinger *et al.*, 2007).

A severidade da doença está relacionada com a idade do indivíduo. Aproximadamente 60% das infecções por HAV em crianças com menos de seis anos de idade são assintomáticas ou brandas enquanto que mais de 70% de infecções em crianças mais velhas, principalmente em adultos e idosos, podem causar hepatite clínica (Fischer *et al.*, 2009).

O curso da hepatite A pode se dividir em quatro fases clínicas: fase de incubação ou período pré-clínico; fase prodrômica ou pré-ictérica; fase ictérica; e período convalescente. Durante a fase de incubação, o indivíduo se apresenta assintomático, apesar da replicação. Este é o período de maior transmissão viral devido à alta carga viral encontrada nas fezes. O tempo de incubação da doença varia de 15 a 50 dias, com média de 30 dias (Paul *et al.*, 1945). A fase prodrômica, também denominada fase pré-ictérica, varia de alguns dias até um pouco mais de uma semana. Essa fase, em mais de 50% dos pacientes, se caracteriza por anorexia, febre, fadiga, cefaléia, mialgia, náusea e vômito, sendo a diarreia, náusea e vômito mais presentes em crianças do que em adultos. Na fase ictérica ocorre o excesso da excreção da proteína bilirrubina, que é o pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina. Na urina essa proteína dá uma coloração amarelada e em hepatopatias é eliminada em grandes quantidades, causando o aparecimento da urina escura (bilirrubinúria). Esse mesmo pigmento causa a icterícia, quando acumulado no organismo pelo mau funcionamento do fígado causado pela hepatite A. A icterícia aparece sob a forma de descoloração amarelada na membrana mucosa, conjuntiva e pele (Zuckerman, 1965).

Outros sintomas são encontrados, tais como: desenvolvimento de colestase (redução do fluxo biliar), reincidência da hepatite, manifestações extrahepáticas e a possível indução de hepatite crônica autoimune do tipo 1 (Schiff, 1992). Ocasionalmente podem ocorrer necroses mais extensas do fígado durante a hepatite aguda, levando ao enfraquecimento da função hepática, caracterizando uma hepatite fulminante, que tem como sintomas febre alta, dor abdominal, vômito e icterícia, seguidos de desenvolvimento de encefalopatia associada a coma profundo (O'Grady *et al.*, 1993). A hepatite fulminante ocorre em 0,14% de pacientes hospitalizados com Hepatite A

(Leung *et al.*, 2005). Em 2006, o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos relatou a ocorrência de óbito em 0,3% de todos os casos de Hepatite A (Dentinger, 2009).

1.7. Diagnóstico Laboratorial

Um paciente com hepatite aguda é inicialmente avaliado com um painel bioquímico do fígado e hemograma completo. As concentrações de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transferase (AST) são indicadores altamente sensíveis à lesão do fígado. A bilirrubina também é medida em um paciente com icterícia (Hollinger *et al.*, 2007).

Clinicamente não há uma distinção entre os agentes causadores da Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, Hepatite D ou Hepatite E. Por esse motivo, existe a necessidade de um diagnóstico sorológico para HAV. Dentre os ensaios sorológicos que distinguem entre as diferentes etiologias virais, existem os ensaios para IgM anti-HAV, IgG anti-HAV, HBsAg, IgM anti-HBc e anti-HCV, dentre outros.

Antes dos sintomas clínicos, o vírus da Hepatite A pode ser encontrado no sangue e nas fezes e ser detectado na infecção experimental de culturas celulares de primatas não-humanos, microscopia imunoeletrônica, RT-PCR ou ensaios imunoenzimáticos (Costa-Mattioli *et al.*, 2003, Feinstone *et al.*, 1973, Hutin *et al.*, 1999, Jansen *et al.*, 1991, Robertson *et al.*, 1992, Sjogren *et al.*, 1987, Yotsuyanagi *et al.*, 1993).

Em ensaios imunoenzimáticos, como o teste de ELISA, o estabelecimento do diagnóstico de Hepatite A aguda se dá pelo exame de amostras de sangue através da detecção do anti-HAV IgM. Embora existam seis genótipos de HAV, todos fazem parte de apenas um sorotipo, não interferindo no diagnóstico sorológico (Bradley *et al.*, 1977, Decker *et al.*, 1981). O ensaio de ELISA IgM anti-HAV é feito pela captura da microplaca com anticorpos anti-IgM humano produzidos em coelhos que reage com o IgM humano contido na amostra. Para a identificação da presença de IgM anti-HAV é adicionado o vírus inativado de Hepatite A e anticorpos anti-HAV conjugados com peroxidase. O resultado positivo é demonstrado por coloração da solução

pela adição do substrato e cromógeno. Se for necessária a análise da imunidade duradoura contra a hepatite A, o ensaio imunoenzimático usado será o de anti-HAV total. O anti-HAV total é um método imunoenzimático competitivo para a determinação de anticorpos contra o vírus da Hepatite A no soro ou no plasma. O ensaio é baseado na competição entre os anticorpos anti-HAV presentes na amostra e anticorpos monoclonais anti-HAV conjugados com peroxidase quando incubados simultaneamente nos poços de uma microplaca recoberta com HAV (Vital et al., 1991). O ensaio de anti-HAV total também dará positivo quando o ensaio de IgM anti-HAV estiver positivo pois ele detecta tanto IgG anti-HAV quanto IgM anti-HAV. A concentração de IgM anti-HAV aumenta em um período de 4 a 6 semanas e então declina para níveis indetectáveis com 3 a 6 meses após a infecção em muitos pacientes, persistindo por mais de 200 dias em 13,5% deles (Kao et al., 1984). O IgG anti-HAV passa a substituir o IgM anti-HAV, persistindo por anos depois da infecção e conferindo imunidade para o resto da vida do indivíduo. O ensaio de anti-HAV total pode ser utilizado na avaliação de imunidade passada, para a soroconversão de um indivíduo depois da vacinação ou na consideração do risco em casos de viagem para alguma região endêmica ou em trabalhos em uma área de risco. Na ausência de IgM anti-HAV positivo, se assume que o anticorpo detectado por esse ensaio é IgG anti-HAV, indicando infecção ou vacinação prévia pelo vírus da Hepatite A (Skinhoj et al., 1977).

1.8. Prevenção e profilaxia

Para um controle efetivo da doença, os métodos são aqueles que previnem a contaminação fecal das mãos, comida, água, ou outras fontes vindas de um indivíduo infectado antes da doença clínica se tornar aparente. Lavar bem as mãos, assim como evitar práticas de trabalho que facilitam a contaminação das mesmas ao entrar em contato com crianças menores de dois anos também são medidas importantes para o controle da Hepatite A. Durante as primeiras duas semanas da doença, ou pelo menos durante duas semanas após o aparecimento da icterícia, é recomendado a restrição do

contato de crianças jovens com seus colegas, pois, tendo uma higiene difícil de controlar, uma criança pode facilmente infectar outras (Hollinger, 1992).

A probabilidade de uma infecção nosocomial na fase ictérica em adultos é muito baixa, diminuindo a necessidade de medidas de prevenção mais drásticas, tais como: isolamento dos pacientes em salas privativas e o uso de máscaras, a menos que haja risco de exposição direta às fezes ou comida e bebidas contaminadas. Se o paciente for uma criança, paciente com incontinência ou recém-nascido há a necessidade de um maior cuidado na prevenção nosocomial da Hepatite A (Favero *et al.*, 1979). A infecção por ocorrência de negligência de trabalhadores da área de saúde por transmissão percutânea é muito baixa, pois a viremia precede a doença clínica (Szmuness *et al.*, 1977).

Em 1944, durante um surto de hepatite A em um campo de verão, foi administrado imunoglobulina intramuscular convencional (IgIM) nos infectados. Dos indivíduos infectados, houve uma redução de 87% nos sintomas (Stokes Jr. *et al.*, 1945). A partir de outros estudos em militares e crianças, (Gellis *et al.*, 1945, Havens Jr. *et al.*, 1945) pôde-se ser capaz de prevenir a Hepatite A anictérica ou ictérica em torno de 80% a 90% quando aplicada há mais de 6 dias antes dos primeiros sintomas da doença. As imunoglobulinas (Ig) são obtidas de plasma humano que foi tratado para inativação viral sendo negativo para vírus da imunodeficiência humana, Hepatites B e C. As Igs são coletadas de qualquer lugar do mundo e podem trazer proteção perante o HAV, pois só existe um sorotipo do vírus. Estudos demonstraram que a imunização passiva por Ig pode ser capaz tanto de suprimir completamente quanto de diminuir a infecção em pessoas suscetíveis ao HAV, dependendo da concentração de anti-HAV administrado e do intervalo da exposição ao tratamento, além de ter de 69% a 89% de efetividade quando administrada duas semanas após a exposição ao vírus (Bianco *et al.*, 2004, Brundage *et al.*, 2006, Cuthbert, 2001, Drake *et al.*, 1954, Hall *et al.*, 1977). A concentração preconizada pela U.S Food and Drug Administration varia entre 30 UI/mL e 60 UI/mL.

Devido aos baixos títulos, depois da administração de Ig, ensaios imunoenzimáticos comerciais para anti-HAV são incapazes de detectar esses anticorpos no sangue a menos que o procedimento tenha sido otimizado para essa detecção (Ambrosch *et al.*, 1991). Baixos níveis de anticorpos

neutralizantes, mesmo assim, podem ser encontrados por pelo menos 14 semanas, dependendo da dose e da concentração do anticorpo no soro, quando este foi avaliado com um ensaio sensível de neutralização, o que demonstra que pequenas doses de anti-HAV são suficientes para prevenir a infecção (Fujiyama *et al.*, 1992, Stapleton *et al.*, 1985).

Outro método importante de prevenção da Hepatite A é a utilização de vacinas inativadas. Até 1995, o único método de imunização era a passiva, que utilizava imunoglobulinas, mas este método não confere imunidade duradoura. Com o desenvolvimento de culturas celulares para o crescimento do vírus da Hepatite A, se alcançou a produção de vacinas anti-HAV. A vacina é produzida por vários laboratórios ao inativar o HAV derivado de cultura de células com a utilização de formalina ou β -propiolactona (Lemon 1994). A imunização primária é intramuscular e consiste em uma dose simples da vacina (1440 EL.U para HAVRIX e 50 U para VAQTA) para adultos e metade da dose para crianças até 15 anos. Uma dose de reforço é recomendada para todos, de 6 a 12 meses (HAVRIX) ou de 6 a 18 meses (VAQTA) após a primeira dose para obter uma imunidade mais duradoura (quadro 1.1) (Fiore *et al.*, 2006, Niu *et al.*, 1998).

Quadro 1.1. Dosagem recomendada da vacina de Hepatite A e esquema de vacinação por faixa etária.

Vacina	Idade	Concentração por dose	Volume (mL)	Doses	Reforço (meses)
HAVRIX	1-18	720 (EL.U.)*	0.5 mL	2	6 a 12 meses
	> 18	1440 (EL.U.)*	1.0 mL	2	6 a 12 meses
VAQTA	1-18	25 U**	0.5 mL	2	6 a 18 meses
	> 18	50 U**	1.0 mL	2	6 a 18 meses

* Unidades do ensaio imunoenzimático (ELISA)

** Unidades

Fonte: (Fiore *et al.*, 2006)

Após a primeira injeção, em adultos a IgM pode ser detectada de 2 a 3 semanas após a aplicação e não existem dados em crianças (Shouval *et al.*, 1993). A durabilidade da imunidade pode ocorrer por pelo menos 25 anos em

adultos e de 14-20 anos em crianças. Já foi demonstrado que a administração simultânea de vacina inativada contra Hepatite A e 3 a 5 mL de IgIM pode fornecer proteção imediata e de longa duração em adultos (Leentvaar-Kuijpers *et al.*, 1992).

Em 1988, foram avaliadas algumas cepas mutantes de HAV que foram diretamente isoladas da cultura celular de fezes humanas e propagadas em células certificadas para produção de vacinas (Provost *et al.*, 1988). Ao utilizar uma dessas vacinas experimentais atenuadas, anticorpos neutralizantes foram detectados a partir do terceiro até o sexto mês após a vacinação em todos os espécimes (Midthun *et al.*, 1991). A vacina foi bem tolerada e o HAV não foi recuperado das fezes ou sangue dos indivíduos. Purcell (Cohen *et al.*, 1989, Purcell, 1991) obteve resultados análogos com a cepa de HAV HM175 isolada diretamente de fezes humanas e propagadas à 35°C em células ACMK.

Devido à alta incidência da doença em crianças, estas são o primeiro foco na estratégia de vacinação. A inclusão da vacina na rotina do Programa Nacional de Imunização em crianças poderia prevenir a infecção em grupos etários em pelo menos um terço dos casos e eliminar a maior fonte de infecção para adultos e crianças. Países como os Estados Unidos, Arábia Saudita, Espanha já implementaram a vacinação universal, enquanto países como a Itália e China implementaram a vacinação apenas em jovens e crianças. A rotina de vacinação em locais com alta incidência da doença tem sido eficaz na prevenção e interrupção de surtos, causando impacto na incidência geral da doença. No Brasil ainda se estuda a implementação da vacina no calendário de vacinação.

1.9. Epidemiologia

Mundialmente a causa mais comum de hepatite viral aguda é a Hepatite A. Essa doença é responsável por, pelo menos, 1,4 milhões de novas infecções por ano (Saha *et al.*, 2009) e representa 55% de todos os casos reportados de hepatite aguda viral (Gaspar *et al.*, 1996). Além disso, a doença é um fator significativo de morbidade e perda socioeconômica em várias partes do mundo. É uma doença entérica transmitida pela via fecal-oral através do

contato pessoa-a-pessoa, pela ingestão de comida e água contaminadas. O vírus é excretado abundantemente pelas fezes (10^8 vírions/mL) e é estável no ambiente por até um mês (McCaustland *et al.*, 1982, Nainan *et al.*, 2006). Frequentemente são encontrados surtos causados por água ou comida contaminada, especialmente em comunidades fechadas como escolas e creches (Morais *et al.*, 2006, Villar *et al.*, 2004). Podem ocorrer casos de infecção pelo HAV adquiridos por contato sexual (anal-oral) e por transfusão de sangue (Nguyen *et al.*, 2009). Na quadro 1.2 são encontrados os grupos de risco para Hepatite A.

Quadro 1.2. Grupos expostos a risco para a transmissão de hepatite A (Adaptado de Nguyen *et al.* 2009).

Grupo de risco	Fator de exposição a risco
Viajantes	Viajantes de países desenvolvidos que viajam para países subdesenvolvidos que podem ser infectados pelo HAV
Homossexuais	Sexo anal-oral
Usuários de drogas injetáveis e não injetáveis	Utilização de drogas contaminadas e seringas contaminadas por HAV
Indivíduos com desordem no fator de coagulação	Fator VII de plasma de doadores com Hepatite A contaminado com detergente-solvente em incubação foi administrado a esses indivíduos
Indivíduos que trabalham manuseando comida	Contaminação com HAV na comida e bebida durante sua preparação
Indivíduos que trabalham com crianças (creche, escola)	Esses indivíduos são infectados ao entrar em contato com crianças com infecção leve ou assintomática
Trabalhadores da área de saúde	Transmissão do paciente para o profissional de saúde
Tratadores de não-humanos primatas	Transmissão do primata suscetível ao HAV para o trabalhador

A infecção por Hepatite A está altamente associada ao grau de saneamento do ambiente e ao nível educacional e socioeconômico dos indivíduos, desse modo, observamos maiores prevalências em áreas sem saneamento básico e com baixo nível socioeconômico e educacional.

De acordo com o grau de endemicidade, a Hepatite A é dividida em quatro padrões (Figura 1.3.): (1) Endemicidade muito baixa: a taxa de doença é

muito baixa e a infecção ocorre tipicamente em adultos (Norte da Europa). Casos de infecção são esporádicos e os indivíduos são normalmente contaminados durante viagens a áreas endêmicas (CDC, 1999); (2) Baixa endemicidade: ocorre em países com alto nível de saneamento, geralmente em países desenvolvidos (Oeste Europeu, Oceania e América do Norte), com as taxas de infecção altas em adultos jovens. O vírus é primariamente transmitido por consumo de água ou comida contaminada, embora alguns casos de transmissão pessoa-a-pessoa tenham sido relatados. Nessas áreas, surtos de fontes comuns são muito freqüentes e grupos expostos ao risco podem ser definidos (Melnick, 1995); (3) Endemicidade intermediária: A endemicidade intermediária ocorre em países que estão passando por um processo de melhorias de saneamento básico. Nessas áreas, a incidência da infecção de HAV está se deslocando de crianças pequenas para adolescentes e jovens adultos. É comum a ocorrência de surtos, a transmissão ocorre por contato pessoa-a-pessoa ou pelo consumo de água (Villar *et al.*, 2002) ou comida contaminada. Esse padrão de transmissão é encontrado em regiões endêmicas na América Latina, Ásia e Meio Leste, cuja média das taxas de soroprevalência tem declinado nos últimos anos (Vital *et al.* 2006). São encontradas altas taxas de prevalências de mais de 90% entre adultos jovens e adolescentes (Braga *et al.*, 2009), o que implica a diminuição de infecções subclínicas em crianças e o aumento de infecções mais graves em adolescentes e adultos (Silva Pde *et al.*, 2007); (4) Alta endemicidade: Correspondem a países subdesenvolvidos, áreas com um baixo grau de saneamento, nas quais 90% das crianças se contaminam até os 10 anos de idade, adquirindo uma infecção assintomática logo no começo da vida (Tanaka, 2000). A transmissão se dá primariamente de pessoa-a-pessoa. É típico da África e do Meio Leste, bem como em várias nações da América Latina e Ásia.

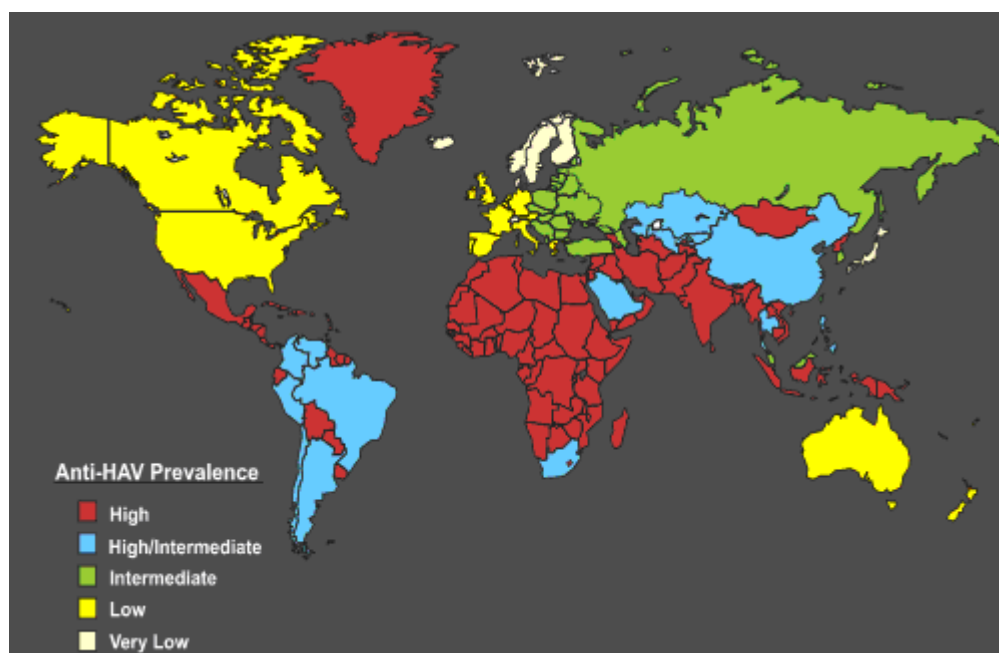


Figura 1.3. Distribuição geográfica da prevalência de anticorpos anti-HAV distribuídos por padrões de infecção (CDC, 2006)

Graças ao aumento de saneamento no país e de programas de conscientização sobre higiene e saúde, o Brasil vive um momento de mudança: de um padrão de alta endemicidade para um padrão de endemicidade intermediária. A incidência da Hepatite A no Brasil diminuiu de 98,1% para 7,8% entre as crianças menores de cinco anos (Vital *et al.*, 1998). No que diz respeito aos adultos, são encontrados níveis de incidência da doença superiores a 90%, indicando o desvio do padrão de alta endemicidade para endemicidade intermediária e, com isso, um aumento potencial para os surtos emergenciais. O número de casos relatados de Hepatite A tem diminuído no Brasil de 20.446 casos no ano de 2004 para 10.706 no ano de 2008; uma queda de 48%. O padrão de casos relatados pelo Sinan em 2008 em relação às regiões do Brasil demonstram que a região mais afetada pela Hepatite A é o Nordeste com 35,1% dos infectados, a região Norte tem 20,8%, no Sudeste há uma incidência de 19,4%, no Sul encontram-se 16,8% dos casos e no Centro-Oeste 7,9% dos casos.

Com o crescimento potencial de surtos emergenciais no Brasil, há a necessidade da produção de ensaios imunodiagnósticos nacionais de baixo custo e alta eficiência e, de preferência, sem desconsiderar o bem estar animal no processo de fabricação. Uma alternativa para o cumprimento dessas

normas é a utilização de imunoglobulina Y, encontrada na gema dos ovos de aves, no diagnóstico da Hepatite A.

1.10. Histórico da Imunoglobulina Y

O sistema imune das aves, como o dos mamíferos, é dividido em dois componentes: o componente não-específico e inato e o componente específico e adquirido. Em 1893, a partir de um experimento, foi demonstrado que o sistema imune das aves tem uma diferença importante em relação ao sistema imune mamífero: as mães passam para a sua progênie parte dos seus anticorpos específicos através das partes fluidas do ovo. Enquanto o ovo ainda é encontrado no ovário, as aves transferem sua IgG do soro para a gema e, quando o ovo passa pelo oviduto, as IgM e IgA encontradas nas secreções do oviduto passam para a clara (Klemperer, 1893).

Por muitas décadas essa nova descoberta ficou esquecida até o momento em que o bem estar animal passou a ser de extremo interesse para a comunidade científica. Essa guinada começou com o trabalho de Russel & Burch em sua publicação de 1959, intitulada "*The principles of Humane Experimental Techniques*" (Russel *et al.*, 1959). Dez anos depois, Leslie e Clem (Leslie *et al.*, 1969) sugeriram que a imunoglobulina encontrada no soro das galinhas deveria ser chamada de imunoglobulina Y (IgY) ao invés de IgG por serem encontradas na gema (yolk) dos ovos das galinhas. Nos 20 anos seguintes muitos pesquisadores reconheceram a importância dos resultados produzidos por Klemperer e, com a chegada dos anos 1980, ocorreu um aumento nas aplicações da IgY, sendo utilizadas como reagentes comerciais secundários, como kits de purificação de IgY, padrões de IgY e anticorpos marcados especificamente contra IgY. Desde 1996, a tecnologia IgY se tornou internacionalmente aceita em termos de descrição e produção no uso de anticorpos IgY. Em 1996 um grupo de trabalho do "European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)" recomendou o uso da IgY em substituição ao IgG mamífero para diminuição da dor causada pela ação invasiva da retirada da IgG dos mamíferos. Em 1999, a tecnologia IgY foi

aprovada como um método alternativo de auxílio ao bem estar animal do Escritório Veterinário do Governo Suíço (Schade *et al.*, 2005).

1.11. Imunoglobulina Y

A IgY é um anticorpo policlonal encontrado em anfíbios, répteis, aves e peixes pulmonados. Como existe uma grande distância filogenética entre esses animais e os mamíferos, há um aumento da imunogenicidade e da síntese desses anticorpos quando os mesmos reagem contra proteínas de mamíferos. Adicionalmente, por causa da distância filogenética, a IgY produzida contra as proteínas de uma determinada espécie de mamíferos podem freqüentemente reagir com proteínas análogas encontradas em outras espécies mamíferas (Bizanov *et al.*, 2006). Outra vantagem encontrada nos anticorpos IgY é a sua alta afinidade e avidéz (Tini *et al.*, 2002).

As aves, tais como os mamíferos, transferem sua imunidade aos seus descendentes, de modo que os anticorpos de galinhas imunizadas são transferidos do soro das galinhas para a gema dos ovos permitindo que essas proteínas sejam encontradas tanto no soro quanto na gema das galinhas. Acredita-se que as imunoglobulinas são incorporadas nos folículos ovarianos por um receptor específico mediado por endocitose existente nesses folículos, daí a necessidade da região Fc para o requerimento efetivo do transporte da imunoglobulina para os folículos ovarianos. A passagem transovariana da IgY demora aproximadamente cinco dias (Mohammed *et al.*, 1998), chegando ao seu título máximo entre os dias 6 a 8 após essa passagem e declinando após esse tempo (Schade *et al.*, 2005). A meia vida da IgY em uma galinha adulta demora aproximadamente de 36 a 65 horas (Patterson *et al.*, 1962). Além da IgY, as imunoglobulinas de aves consistem das classes IgM e IgA, porém a IgY é o mais abundante no soro, variando de 5 a 15 mg/ml em galinhas poedeiras, sendo encontrada em apenas um ovo a quantidade de 100 mg a 200 mg do anticorpo (Schade *et al.*, 2005). A IgM é o segundo anticorpo mais encontrado no soro com uma concentração de 0,3-0,5 mg/ml e são encontrados somente traços de IgA (Kitaguchi *et al.*, 2008).

A retirada da IgY geralmente ocorre com a coleta dos ovos, que é rápida, barata e simples. Do ponto de vista do bem estar animal a utilização da IgY é extremamente importante, pois a retirada diária dos ovos previne o repetitivo sangramento e dor nos animais de laboratório normalmente utilizados para a produção de anticorpos (Cova, 2005). Após a coleta, os anticorpos podem ser estocados nos ovos a 4°C por pelo menos 1 ano (Jensenius *et al.*, 1981). Além disso, grandes quantidades de anticorpos podem ser obtidos a um custo relativamente baixo, pois o cuidado com as aves não apresenta alto custo, e quando comparado com a quantidade de anticorpos encontrados no soro de coelhos, a gema dos ovos de galinha contém uma quantidade 3 vezes maior de IgY do que a encontrada de IgG no soro de coelhos (Jensenius *et al.*, 1981).

Desde os anos 1950 vários métodos de purificação da IgY tem sido estabelecidos, tais como a separação das proteínas (levitinas) das lipoproteínas (lipovitelinias) e do resto dos lipídios da gema usando extração com solventes orgânicos, tais como o baseado em clorofórmio que ainda continua em uso. Outros métodos são baseados em cromatografia de afinidade ou na diluição da gema seguida de um processo de congelamento-aquecimento depois do qual o processo consiste em cromatografia de trocas de íon e/ou precipitações de sal. As precipitações de sal combinam vários sais, tais como o polietileno glicol, dextran sulfato, dextran blue, sulfato de sódio, sulfato de amônia, ácido caprílico e citrato de sódio. Mais recentemente, novos métodos combinando a remoção de lipídios por clorofórmio com sulfato de amônio em técnicas de precipitação têm demonstrado um bom resultado na alta pureza encontrada dos anticorpos purificados (Bizanov *et al.*, 2006).

O ponto isoelétrico da imunoglobulina Y varia entre 5,7 e 7,6 (de Almeida *et al.*, 2008). Foi demonstrado que sua estabilidade ao calor chega a 60° C, o que pode ser aumentado a 70° C pela adição de açúcares (Jaradat *et al.*, 2000). Além disso, a IgY é resistente a pH de 4-9, sendo mais sensível que a IgG de coelho à desnaturação ácida, uma vez que esta última perde mais rapidamente sua atividade entre pH 3 e pH 4 (Shimizu *et al.*, 1992). IgY não se liga ao complemento mamífero ou a seus receptores Fc, resultando em menor número de reações cruzadas (Benson *et al.*, 1961). Ademais, a IgY de galinhas não é reconhecida pela proteína A do *Staphylococcus* ou proteína G do

Streptococcus (as duas proteínas se ligam a região Fc de imunoglobulinas) (Hansen *et al.*, 1998). Como outra vantagem, se demonstrou que a IgY não tem reatividade cruzada com a IgG (Kummer *et al.*, 1998). A IgY também não se liga ao fator reumatóide, que é um auto-anticorpo que reage com a porção Fc da IgG mamífera e causa a artrite reumatóide (Larsson *et al.*, 1991), sendo igualmente uma fonte maior de interferência de muitos imunoenaios. A imunoglobulina Y ainda apresenta a vantagem de apresentar uma redução na cor de fundo de ensaios imunoenzimáticos. Um resumo das principais características de IgY e IgG está exposto no quadro 1.3.

Quadro 1.3. Características estruturais, físico-químicas e imunológicas das imunoglobulinas IgY e IgG

Comparação	IgG	IgY
Visão geral	Relativamente maduro no desenvolvimento tecnológico e aplicação	Relativamente novo no desenvolvimento de produtos e aplicação
Animais	Mamíferos	Aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados
Fontes	Soro	Soro e gema do ovo
Peso molecular (SDS-PAGE)	Todo:150kDa, cadeia leve:22kDa x 2, cadeias pesadas:50kDa x 2	Todo:180kDa, cadeia leve:21kDa x 2, cadeias pesadas:70kDa x 2
Diferenças estruturais básicas	A cadeia pesada consiste de 3 domínios constantes e um variável com uma região de dobradiça flexível.	A cadeia pesada consiste de 4 domínios constantes e um variável, com uma região de dobradiça menor e menos flexível
Resposta imune aos antígenos mamíferos	Afetado pela homologia fenotípica	Aumentado pela diferença fenotípica
Mecanismos de maturação da afinidade	Hipermutação somática	Gene conversão pseudo-V
Avidez	Seletivamente alta	Geralmente alta
Ligação não-específica	Alta para humanos (antígeno)	Baixa para humanos (antígeno)
Estabilidade	Boa, estável em pH 3-10 acima de 70°C	Boa, estável em pH 4-9, acima de 65°C
Hidrofobicidade	Menos hidrofóbico que IgY	Região Fc é hidrofóbica

Com todas essas vantagens, a IgY já foi utilizada com sucesso em uma grande variedade de métodos de diferentes áreas de pesquisa, diagnósticos, aplicações médicas e biotecnologia (Cova, 2005). Foram relatadas atuações no campo de produção de testes diagnósticos em ensaios imunoenzimáticos para a detecção de antígeno de *Schistosoma japonicum* (Lei *et al.*, 2009), anti-Food-and-Mouth vírus (Veerasami *et al.*, 2008), para detectar vírus da leucemia bovina (Juliarena *et al.*, 2007), detecção de *Campylobacter jejuni* (Hochel *et al.*, 2004), detecção de vírus Sendai em porcos (Kvietkauskaitė *et al.*, 2004) e para detectar *Escherichia coli* (Sunwoo *et al.*, 2006). Além de ensaios imunoenzimáticos, foi produzido um imunoswab diagnóstico para a detecção do vírus SARS utilizando IgY (Kammila *et al.*, 2008). A IgY é resistente à barreira gastrointestinal, por isso, várias pesquisas realizaram terapias de imunização passiva por ingestão oral de IgY em produtos fortificados de alimentos e gema de ovo purificada para prevenção ou controle de infecções intestinais, como aqueles causados pelo coronavírus bovino, *Yersinia ruckeri*, *E.coli*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Helicobacter pylori* Urease B, *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* e *Rotavirus* (Shin *et al.*, 2002, Tini *et al.*, 2002). A IgY também teve resultados na resposta imune da prevenção da infecção bacteriana. Foi demonstrado que uma ligação do anticorpo à bactéria pode ser essencial para promover suas propriedades antibacterianas (Lee *et al.*, 2002).

Outras pesquisas relataram a produção de IgY específicos contra: *Streptococcus mutans* Serotipo c (Chang *et al.*, 1999), vírus Sendai (Bizanov *et al.*, 2006), veneno de cobra Africana (de Almeida *et al.*, 2008), SARS coronavírus (Fu *et al.*, 2006), *Rotavirus* (Hatta *et al.*, 1993), *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Shin *et al.*, 2009) e vírus da raiva (Motoi *et al.*, 2005). Além disso, foram avaliados a inibição in vitro de *Candida albicans* utilizando IgY (Wang *et al.*, 2008), o potencial da imunoglobulina Y anti-*H.pylori* no tratamento de infecções por *H.pylori* (Shin *et al.*, 2002), os efeitos da IgY contra *Candida albicans* e *Candida spp* (Fujibayashi *et al.*, 2009) e a inibição do *Staphylococcus aureus* (Guimaraes *et al.*, 2009).

A imunoglobulina Y reúne grandes vantagens para sua utilização na pesquisa e na área de saúde, e por isto tem sido uma alternativa em

substituição à utilização de anticorpos IgG de mamíferos, diminuindo o sofrimento ao animal.

1.12 Estrutura molecular da Imunoglobulina Y

A estrutura geral da molécula de IgY consiste em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, como o que ocorre com os anticorpos de mamíferos. A cadeia pesada é indicada pela letra grega μ , e contém um domínio variável e quatro domínios constantes, o que a diferencia da cadeia pesada da IgG de mamíferos que tem três domínios constantes, como demonstrado na figura 1.4.

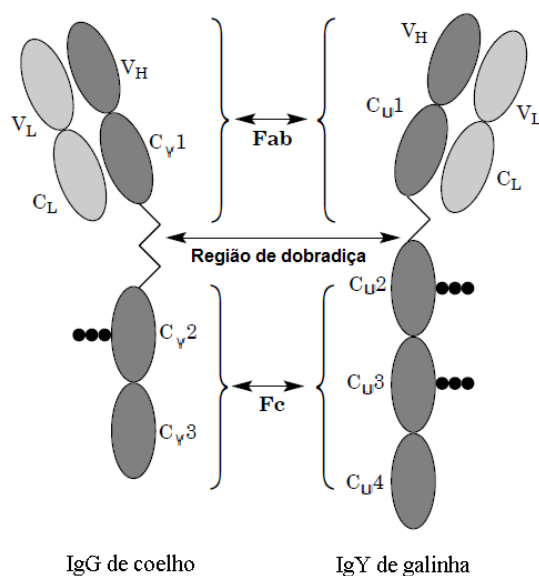


Figura 1.4. Comparação da estrutura molecular entre a IgG dos mamíferos e IgY das galinhas (Schade *et al.*, 2005).

O peso molecular da IgY é igual a 167,250 Da de acordo com a espectrofotometria de massa. A cadeia leve consiste em um domínio variável e um domínio constante com peso total de 18,660 Da, já a cadeia pesada tem o peso molecular de 65,105 Da e o fragmento Fab tem o peso molecular de 45,359 Da. É encontrada uma homologia entre os domínios Cu3 e Cu4 da IgY e os domínios Cy2 e Cy3 do IgG mamífero. Acredita-se que o domínio Cu2 seria a região de dobradiça da IgG, sendo menos desenvolvido na IgY. O que resulta em menor flexibilidade da região Fab em comparação a IgG. Como na IgG, a região Fc da IgY é o local onde se encontra a maior parte das funções

efetoras, essa região contém duas cadeias laterais de carboidratos em contraste com apenas uma da IgG (Figura 1.4.).

Ao se comparar seqüências de DNA da IgY, ficou claro que entre a divergência dos Synapsídeos (grupo ancestral dos mamíferos) há 310 milhões de anos atrás e a divergência dos mamíferos não-eutérios (mamíferos não-placentários) há 166 milhões de anos atrás ocorreu uma duplicação do gene μ . Essa duplicação do gene μ foi seguida por uma diferenciação em duas classes de imunoglobulinas únicas dos mamíferos, a IgG e a IgE, o que é demonstrado pela sua seqüência nos monotremados (mamíferos que põem ovos) (Taylor *et al.*, 2008). O seqüenciamento de cDNA da cadeia pesada (μ) revelou que o domínio Cu2 da IgY das aves está conservado na imunoglobulina E mamífera (C ϵ 2), mas se truncou para formar a região de dobradiça da IgG. Então, um par de domínios ortólogos deve ter existido no ancestral comum (IgY-like) anteriormente à duplicação e subsequente divergência na linhagem mamífera. Um dos maiores avanços adquiridos pelo IgG foi a aquisição da dobradiça entre os domínios Cy1 e Cy2, o que proporcionou a adição da flexibilidade segmentada e diversidade funcional às regiões Fab. A presença em comum da seqüência Cisteína-Prolina na ligação genética C-terminal da dobradiça da cadeia- γ e os domínios C μ 2 das cadeias μ e ϵ , junto com as homologias de Cy2: Cy3 e Cy3: Cy4, suportam a hipótese de que a região da dobradiça apareceu pela condensação do domínio C μ 2, e fornece uma evidência adicional da relação entre as cadeias μ , ϵ e γ . As posições adjacentes dos genes de γ e ϵ no locus IgH são compatíveis com a ocorrência de um evento relativamente recente de duplicação-genética (Warr *et al.*, 1995).

Em pássaros anseriformes (patos e gansos), alguns répteis (particularmente tartarugas) e peixes pulmonados (pirambóia) encontra-se um IgY truncado de peso molecular de 120 kDa. As duas formas de IgY (inteira e truncada) podem tanto conviver juntas em um indivíduo (como ocorre em algumas tartarugas e pássaros anseriformes) ou podem ser encontradas com exclusividade em um animal (galinhas produzem só a forma inteira de IgY e algumas tartarugas apenas a forma truncada). A IgY truncada não possui os dois domínios C-terminais (Cu3 e Cu4) da cadeia pesada. A terminologia utilizada para a molécula intacta da IgY truncada é a IgY (Δ Fc) e para sua cadeia pesada é $\mu(\Delta$ Fc) (Kitaguchi *et al.*, 2008).

1.13. Adjuvante CpG – ODN

Adjuvantes se definem por qualquer produto (ou associação de componentes) que aumenta ou modula a resposta imune celular ou humoral contra um antígeno (Moingeon *et al.*, 2001), entre eles se encontra o oligodesoxinucleotídeo CpG-ODN.

Nos anos 1980, Tokunaga (Tokunaga *et al.*, 1984, Tokunaga *et al.*, 1988) demonstrou que o DNA bacteriano teria atividades antitumorais. Ao prosseguir o estudo do DNA bacteriano, Tokunaga e seus colaboradores identificaram palíndromos de seis bases auto-complementares que eram responsáveis por efeitos imunoestimuladores (Kuramoto *et al.*, 1992). Estudos posteriores visando descobrir a seqüência palíndromica necessária para a ocorrência desses efeitos imunoestimuladores chegaram à conclusão de que a seqüência deve conter pelo menos um dinucleotídeo CpG para ser auto-estimulante, ou seja, conter uma base citocina (C) tendo como base seguinte uma base guanina (G). Foi descoberto também que a seqüência de CpG do DNA bacteriano reconhecida pelo sistema imune de cada indivíduo vertebrado é diferente, sendo então espécie – específico (Krieg, 1999).

O DNA dos vertebrados tem uma freqüência bastante menor de seqüências CpG do que no DNA bacteriano, sendo encontrada em uma porcentagem quatro vezes menor. Além disso, suas seqüências CpG são metiladas na posição 5' da citocina, o que não ocorre nas seqüências CpG das bactérias, que não são metiladas. A falta de metilação nas seqüências CpG sugere a possibilidade da evolução do sistema imune no reconhecimento de motivos CpG não-metilados do DNA bacteriano e a diferenciação do que é próprio do organismo vertebrado e do que é encontrado em um indivíduo procariota (Krieg 1999).

O CpG-ODN pode ser utilizado como adjuvante ao aumentar e modular a resposta imune contra um determinado antígeno. Já foi provado que o CpG-ODN produz resposta imune em galinhas com a produção de IgY contra o antígeno imunizado (Vleugels *et al.*, 2002), podendo ser utilizado para o aumento da produção de IgY anti-HAV.

1.14. Relevância da utilização da IgY no diagnóstico da Hepatite

A

O perfil epidemiológico da Hepatite A está mudando em países em desenvolvimento, tal como ocorre no Brasil (Villar *et al.*, 2002, Vitral *et al.*, 2006). Nesses países a doença era altamente endêmica, porém atualmente devido ao aumento nas condições de saneamento básico e de programas de conscientização de higiene e saúde, houve um aumento de indivíduos susceptíveis e, conseqüentemente, aumento na ocorrência de surtos e na idade média em que os indivíduos são acometidos pela doença. Esta situação traz grandes prejuízos à saúde pública, visto que os indivíduos de idades mais avançadas estão mais sujeitos a sofrerem os sintomas mais severos da doença, podendo evoluir para a hepatite fulminante (Willner *et al.*, 1998).

Os testes de diagnóstico para Hepatite A utilizam IgG obtidas de mamíferos, o que eleva o custo dos kits de diagnóstico. A retirada da IgG demanda coleta de sangue, o que pode provocar dor e mal estar nestes indivíduos. A produção de anti-HAV em animais de laboratório apresenta um baixo rendimento e, por isso, atualmente, soro de pacientes na fase convalescente da doença são utilizados para a produção de anticorpos de captura e conjugados para sua utilização nos kits para detecção de anticorpos contra o HAV.

Ao avaliar a necessidade de se obter um teste de diagnóstico brasileiro para Hepatite A de baixo custo, uma alternativa é a utilização de imunoglobulina Y retirada de galinhas poedeiras. Os anticorpos purificados da gema dos ovos das galinhas tem várias vantagens em relação à utilização de anticorpos purificados de IgG mamífero, tais como: um gasto três vezes menor em sua produção; a retirada de IgY não proporciona dor ao animal, pois é feita a partir da coleta de seus ovos; não se liga ao complemento mamífero, à proteína A e G e ao fator reumatóide. Portanto, possui bastante valor na produção de um teste diagnóstico, barato e de boa qualidade.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver um ensaio imunoenzimático para detecção de anti-HAV total utilizando como captura e conjugado anticorpos IgY anti-HAV produzidos em galinhas imunizadas contra o vírus da Hepatite A.

Objetivos específicos

- Determinar o melhor inóculo para o método de produção de IgY anti-HAV em gemas de ovos de galinhas poedeiras imunizadas com o vírus da Hepatite A;
- Conjugar a IgY anti-HAV com peroxidase para ser utilizada em testes de diagnóstico;
- Avaliar a utilização da IgY anti-HAV como captura e conjugado em testes para o diagnóstico da Hepatite A;
- Determinar os parâmetros de avaliação do teste imunoenzimático utilizando IgY anti-HAV;

3. Materiais e métodos

3.1. Parecer do Conselho de Ética para a utilização de galinhas

Foi enviado para o Conselho de Ética para utilização de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz um pedido para o uso de galinhas no presente projeto e a retirada e utilização de seus ovos como amostras. O Conselho de Ética estabeleceu que a aprovação não seria necessária, pois as galinhas apenas sofreriam com as vacinações necessárias, duas imunizações e um reforço. Além disso, as amostras de IgY seriam retiradas da coleta de seus ovos, não causando injúrias as galinhas.

3.2. Utilização das amostras de sangue

Todas as amostras de sangue utilizadas pelo projeto para avaliação do teste foram adquiridos com o consentimento dos participantes (anexo I)

3.3. Produção do vírus da Hepatite A

Para a produção do HAV foram utilizadas as células FRhK-4, que são células de rim fetal de macaco Rhesus tratadas para cultura do vírus de Hepatite A (Gaspar *et al.*, 1992).

3.3.1. Propagação das células FRhK-4

Materiais

- Células FRhK-4
- Meio de cultura 199
- Soro fetal bovino (Gibco)
- Bicarbonato de Sódio (Merck, Brasil)
- Aminoácidos não-essenciais 0,1 mM (Invitrogen, Estados Unidos)
- Hepes 25 mM (Invitrogen, Estados Unidos)
- Gentamicina (SIGMA, Alemanha)

- PBS pH 7,4 estéril
- Tripsina

Método

As células FRhK-4 foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em “banho-maria” a 37°C para que voltassem ao seu metabolismo normal. Após o descongelamento celular, as células foram propagadas ao se adicionar 0,5 mL da cultura celular em 10 mL do meio de cultura 199 suplementado com soro fetal bovino, 4,4% de bicarbonato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 1% de gentamicina. Em seguida, as células foram examinadas microscopicamente para visualizar possíveis fontes de contaminação, assim como a morfologia normal e 100% de confluência. As células foram propagadas por sete dias na estufa a 37°C (Fanem, Brasil) até a formação de monocamada celular. Após esse período, o meio de cultura foi retirado da garrafa e esta foi lavada com PBS. Em seguida, foi adicionado 2 mL de tripsina para uma garrafa de 75cm³ ou 3 mL para uma garrafa de 175cm³ e as garrafas foram colocadas na posição horizontal para haver o contato entre as células em sua monocamada e a tripsina. Houve uma incubação a 37°C por 3-5 minutos e quando as células se soltaram da superfície, foram aliquotadas em diferentes garrafas e ocorreu a adição do meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino seguindo de uma incubação à 37°C por 24 horas.

3.3.2. Propagação e liberação do vírus da Hepatite A

Materiais

- Células FRhK-4
- Meio de cultura 199 suplementado com 2% de soro fetal bovino
- PBS pH 7,4 estéril
- Gelo seco
- Etanol 95%
- Vírus da Hepatite A (cepa HAF-203)

Método

Após a passagem, de acordo com o crescimento celular obtido na garrafa, foi feita a propagação do vírus da hepatite A. Para isso houve a necessidade da retirada total do meio da garrafa e a inoculação de 2mL do vírus para cada garrafa de 75cm³ ou 3 mL do vírus em cada garrafa de 175 cm³. A garrafa, então, foi preenchida com 70 mL do meio 199 suplementado com 2% de soro fetal bovino e incubada a 37°C na estufa por 14 dias. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e a monocamada lavada com 10 mL de PBS estéril. Após a lavagem, houve o acréscimo de 3 mL de PBS estéril a cada garrafa. As células sofreram rompimento por cinco ciclos de congelamento e descongelamento para remoção de debris e liberação de partículas virais. Em cada ciclo, cada garrafa foi depositada no gelo seco (-80°C) e etanol 95%, após o congelamento, colocada de volta na estufa a 37°C para seu descongelamento. O material viral foi aliquotado em tubos de poliestireno devidamente identificados e armazenado a -70°C para ser utilizado posteriormente.

3.4. Detecção e Quantificação das partículas virais produzidas

As partículas virais de Hepatite A foram quantificadas após a sua produção pela técnica de RT-PCR em tempo real. Para tal, foi necessária a extração do RNA viral, a transcrição reversa do RNA para cDNA e a amplificação e detecção do material genético pela técnica de PCR (De Paula *et al.*, 2007). A extração utilizou o kit de extração da Promega.

3.4.1. Extração do RNA do vírus HAV em amostras de células FRHK4

Materiais

- Vírus da Hepatite A (Cepa HAF-203)
- Kit de extração de RNA da Promega (SV total RNA isolation system, Estados Unidos)
- Etanol 95%
- Bicarbonato de Sódio (Merck, Brasil)

- Aminoácidos não-essenciais 0,1 mM (Invitrogen, Estados Unidos)
- Hepes 25 mM (Invitrogen, Estados Unidos)
- Gentamicina (SIGMA, Alemanha)
- PBS pH 7,4 estéril
- Gelo seco
- Tripsina

Método

No início da extração, foram adicionados 300 µL de cultura celular em tubos de 1,5 mL. Posteriormente, adicionou-se 350 µL do tampão de diluição de RNA (RDA) a cada tubo. A solução foi misturada por inversão de 3-4 vezes e colocada em “banho-maria” a 70 °C por 3 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram centrifugados a 13200xg por 10 minutos a -20 °C. O sobrenadante (lisado e clarificado) foi transferido para um eppendorf, de modo que o microtubo não se misturasse com o sobrenadante. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de etanol 95% e essa solução foi transferida para coluna do kit de extração e submetida à centrifugação a 13200 x g por 60 segundos, a -20 °C. O tubo utilizado foi descartado e a coluna colocada em um tubo novo. À essa coluna foram adicionados 600 µL do tampão de lavagem (RWA) e, então, centrifugada a 13200xg por 1 minuto, a 20 °C. Houve uma nova troca dos tubos coletores da coluna e foi feita uma solução contendo 40 µL do tampão Yellow core, 5 µL de Cloreto de manganês ($MnCl_2$) 0,09M e 5 µL de DNase I. Foram adicionados 50 µL dessa solução na coluna de cada tubo e foram incubados por 15 minutos, a 20 °C. Após a incubação, 200 µL de DNase stop solution (DSA) foram adicionados e os tubos sofreram nova centrifugação a 13200xg por 1 minuto e, em seguida, foram adicionados 600 µL do tampão de lavagem e centrifugados novamente a 13200xg por 1 minuto, a 20 °C. O tubo foi trocado e à coluna foi adicionado 250 µL do tampão de lavagem e centrifugados a 13200xg por 2 minutos a 20 °C. Posteriormente as colunas foram transferidas para um novo tubo de eluição, adicionando-se 100 µL de água RNase free para eluir o RNA. As colunas foram submetidas a uma última centrifugação a 13200xg por 1 minuto, a 20 °C. A coluna foi removida e descartada, enquanto o RNA foi armazenado a -70 °C.

3.4.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Materiais

- Random primers (20pmol/μL) (Invitrogen, EUA)
- RNA viral
- dNTP (1,25 mM) (Invitrogen, EUA)
- DTT (0,1 M) (Invitrogen, EUA)
- RNAsin (1U/ μL) (Invitrogen, EUA)
- Tampão de reação da enzima 5X MMLV-RT (Invitrogen, EUA)
- Enzima MMLV-RT (1U/ μL) (Invitrogen, EUA)

Método

Em um tubo eppendorf de 1,5 mL acrescentou-se 10 μL do RNA viral, 0,5 μL de RNAsin (inibidor de RNA), 2 μL de Random primers e 2 μL de dNTP (desoxirribunocleotídeos trifosfatos). A solução foi incubada a 65°C por 5 minutos. Após a incubação, se acrescentou a cada tubo 4 μL do tampão de reação da enzima 5X MMLV-RT (Moloney murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), 2 μL de DTT (co-fator da enzima transcriptase reversa) e 1 μL da enzima MMLV-RT. As amostras sofreram incubação a 37°C durante 60 minutos. Após a incubação, as amostras sofreram outra incubação a 65°C durante 10 minutos para inativação da enzima. O material foi armazenado a uma temperatura de -20°C.

3.4.3. PCR qualitativo e Eletroforese em gel de agarose

Materiais

- dNTP (1,25 mM) (Invitrogen, EUA)
- Tampão de reação da enzima Taq DNA polimerase 10 X (Promega, EUA)
- MgCl₂ (50mM) (Promega, EUA)
- Primer senso “5” (10pmol/μL) (Invitrogen, EUA)
- Primer antisenso “F₇₈₈” (10pmol/ μL)
- Água DNase/RNase free
- Taq DNA polimerase (Promega, EUA)

- DNA complementar (cDNA)
- Tampão da amostra
- Padrão do peso molecular ϕ x174 (20x diluído) (GIBCO, EUA)
- Agarose
- Brometo de etídio a 0,5% (Promega, EUA)

Método

O PCR qualitativo foi utilizado para detecção da região 5' não codificante completa do HAV. Foram utilizados um par de oligonucleotídeos para a amplificação do material genético "5" (5'-CCATCGATGGTAATACGACTCACTATAGTTCAA-3') e "F₇₈₈" (5'-CCACTCCCAACAGTCTGGAAAAT-3'). Foi adicionada uma mistura contendo 4,0 μ L de dNTP, 2,5 μ L do tampão de reação da enzima Taq DNA polimerase 10x, 1,5 μ L de MgCl₂, 1,0 μ L do primer sense "5", 1,0 μ L do primer anti-sense "F₇₈₈", 9,7 μ L de água DNAse/RNAse free, 0,5 μ L da enzima Taq DNA polimerase e 5 μ L do cDNA da amostra. Como protocolo para o PCR, a reação foi submetida a uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 63,1°C por 30 segundos para que ocorresse a hibridização dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para a sua extensão. Para confirmação da amplificação, um gel de eletroforese foi feito contendo agarose a 1,5% e brometo de etídio a 0,5%. Em cada orifício do gel foram aplicados 8,0 μ L do produto da reação do PCR, 2,0 μ L do tampão da amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol) e 10 μ L do padrão do peso molecular ϕ x174 (20x diluído) (GIBCO, NI, EUA). O produto amplificado foi visualizado em luz ultravioleta no transiluminador após corrida em gel de eletroforese na presença de brometo de etídeo para a visualização das bandas de DNA de 788 pares de bases. Em seguida, o produto do PCR foi armazenado a -20°C.

3.4.4. Quantificação de partículas virais

Materiais

- Água DNAse/RNAse free (Gibco, EUA)

- 1X TaqMan Universal PCR Master mix (tampão, dNTPs com UTP, AmpERASE UNG e AmpliTaq Gold DNA polimerase (Roche, EUA)
- Assay by design (300nM de cada primer iniciador e 150 nM da sonda) (Gentec, EUA)
- DNA complementar (cDNA)
- Uracil- N-glicolase (UNG)

Método

A quantificação das partículas virais foi feita através de PCR em tempo real e a curva e padronização da técnica foram descritas por De Paula e colaboradores em 2007. A sonda tinha como sequência FAM 5'-ACTCATTTTTTCACGCTTTCTG-3', o oligonucleotídeo senso utilizado foi o 5'-CTGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC-3' e o oligonucleotídeo anti-senso utilizado foi o 5'-GAGAGCCCTGGAAGAAAGAAGA-3'. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema 7500 da Applied Biosystems de PCR em tempo real. Inicialmente, foi preparado para cada corrida um mix contendo 12,5 µL de 1x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1,25 µL de assay by design, 4 µL de água DNase/RNase free e 5 µL do cDNA. Foi realizada a etapa inicial a 50°C por 2 minutos, para descontaminação inicial da placa com Uracil- N-glicolase e, após uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A fluorescência é testada ao final da etapa de hibridização da sonda.

3.5. Utilização das galinhas

Neste estudo, foram utilizadas 20 galinhas com 14 dias de vida da espécie Isa Brown. Todo o trabalho com as galinhas foi realizado no Centro Universitário da Serra dos Órgãos, (FESO, Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil) onde elas foram acomodadas em um biotério especial com regime de 12 horas com luz e 12 horas sem luz, temperatura ambiente de 24°C e umidade relativa de 70-80%. Cada galinha foi mantida em gaiolas individuais com água e alimento comercial sendo oferecido “ad libitum” de acordo com seu estágio de vida (figura 3.1.). As galinhas, quando compradas, vieram com atestado de que

estas eram livres de patógenos e após seu acondicionamento no laboratório foram vacinadas pela via nasal contra o vírus Fowlpox e contra o vírus NewCastle. As galinhas sofreram eutanásia com 211 dias de vida, 16 semanas após o começo da postura dos ovos, sob anestesia profunda. Todos os procedimentos experimentais foram feitos de acordo com o Guia de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório (Wolfle *et al.*, 1996).



Figura 3.1. Acondicionamento das galinhas (Fonte: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC/Fiocruz)

3.6. Imunização das galinhas poedeiras

Para a imunização das galinhas poedeiras para produção de imunoglobulina Y anti-HAV no soro e nas gemas dos ovos das galinhas, as 20 aves recém nascidas foram divididas em 5 grupos, cada grupo conteve 4 indivíduos e recebeu um tipo de inóculo diferente (Figura 3.2.).

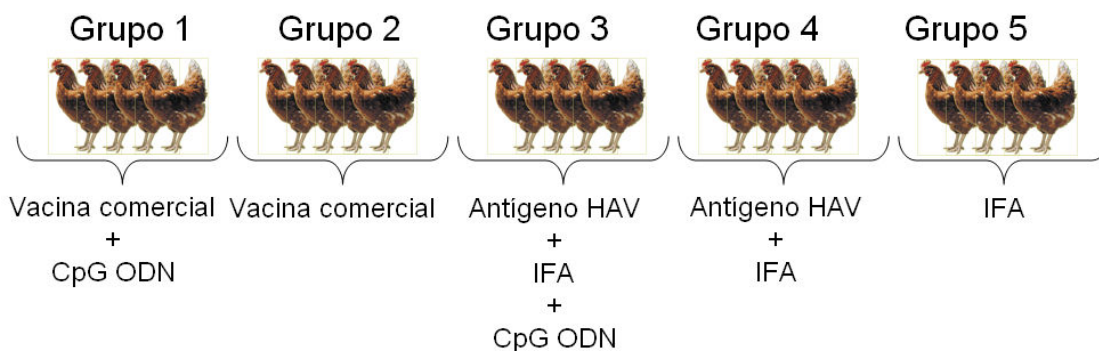


Figura 3.2. Esquema da imunização das galinhas (Fonte: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC/Fiocruz)

Materiais

- Vacina pediátrica comercial inativada de Hepatite A (1mg/mL) (Integrate DNA Technologies, EUA)
- CpG-ODN (seqüência de oligodesoxinucleotídeos com efeito imunoestimulatório) 1µg/ µL (Prodimol)
- Vírus da Hepatite A (5×10^7 cópias/mL)
- Adjuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma-aldrich)

Método

As galinhas do grupo 1 e as do grupo 2 foram inoculadas com a vacina comercial inativada contra Hepatite A. No grupo 1, além da vacina, houve a inoculação de 20 µl do adjuvante CpG-ODN (1µg/ µL). Os grupos 3 e 4 foram inoculados com 100 µL do HAV produzidos em cultura celular e 100 µL do adjuvante incompleto de Freund. No grupo 3 também houve a inoculação de 20 µl de CpG-ODN. O grupo 5 foi o grupo controle, com o inóculo apenas do adjuvante incompleto de Freund (Quadro 3.1.).

As imunizações ocorreram intramuscularmente e foram realizadas com um mês de diferença entre cada uma. Dois meses após a primeira imunização foi feito um booster a fim de estimular a produção de anticorpos.

Quadro 3.1. Inoculações ocorridas por grupo

Grupo	Inoculações
1	200 µl de vacina + 20 µl de CpG-ODN
2	200 µl de vacina
3	100 µl de HAV + 100 µl de IFA + 20 µl de CpG-ODN
4	100 µl de HAV + 100 µl de IFA
5	100 µl de IFA

Nos dias 0, 30, 60 e 90 (Figura 3.3) as galinhas foram pesadas e foi realizada a coleta de sangue na veia da asa (Figura 3.4). O sangue coletado foi centrifugado por 6 minutos a 3500xg para monitorar a soroconversão através

da pesquisa de anticorpos anti-HAV por teste imunoenzimático comercial (Biokit Elisa anti-HAV). Os ovos foram coletados por 16 semanas a partir do 20º dia após a terceira imunização e estocados a -20 °C. Depois desse período as galinhas foram mortas por exsanguinação utilizando barbitúricos por anestesia profunda.

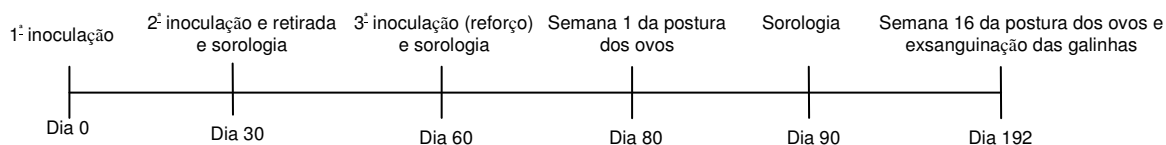


Figura 3.3. Linha do tempo da imunização e postura dos ovos das galinhas poedeiras.



Figura 3.4. Coleta do sangue das galinhas poedeiras

3.7. Purificação da Imunoglobulina Y

A partir da coleta dos ovos foi estabelecida a purificação da gema para a obtenção da Imunoglobulina Y. O protocolo estabelecido seguiu o método de Polson de 1985 (Polson *et al.*, 1985). O método consiste na separação da imunoglobulina Y das proteínas e gorduras da gema pela centrifugação e precipitação com polietileno glicol 6000, seguida de uma precipitação final pelo álcool (Figura 3.5.).

Materiais

- Tampão fosfato Salina (PBS) (ph 7,5)
- Polietileno glicol 6000 (PEG 6000) (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Etanol 70%

Método

Como pode ser visualizado na figura 3.5, inicialmente à cada gema foi adicionado quatro partes de PBS e a pulverização de PEG 6.000, 3,5% (p/v) (1). A mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada por 25 minutos (5.000xg) (2). Após a centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante decantado por um funil com papel de filtro (3). Em seguida houve a adição de PEG 6.000 a uma concentração final de 12% (p/v) (4) e a mistura foi homogeneizada, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido novamente em 25 mL de PBS. Foi pulverizado PEG 6.000 a uma concentração final de 12% (p/v) (5) e essa solução foi incubada e centrifugada como descrito anteriormente, ocorrendo o descarte do sobrenadante. O precipitado foi dissolvido em 2,5 mL de PBS a 0°C e 2,5 mL de etanol à temperatura de -20°C (6). Ocorreu uma última centrifugação (10.000xg) por 25 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 2,5 mL de PBS (7).

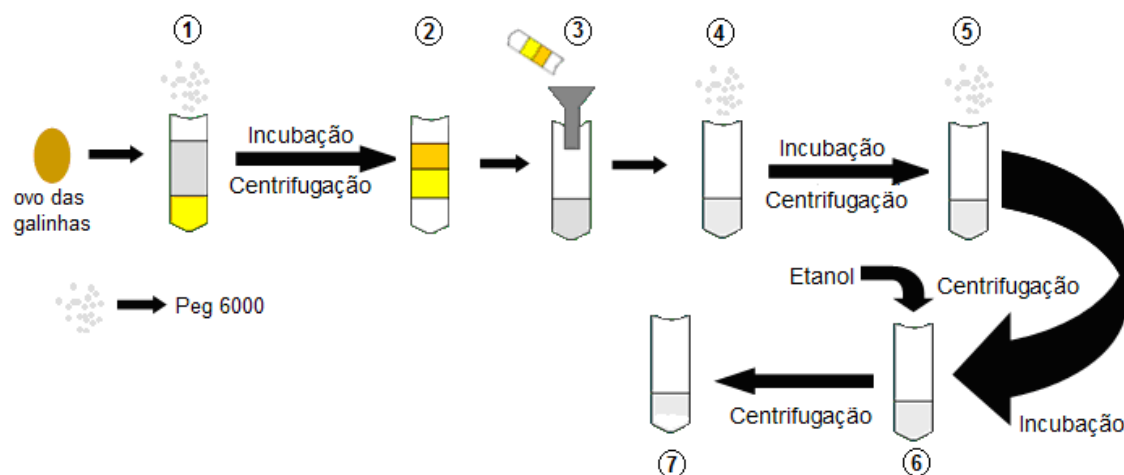


Figura 3.5. Esquema da purificação da imunoglobulina Y utilizando o método de Polson de 1985 (Fonte: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC/Fiocruz).

Para a determinação da concentração da proteína foi realizada a espectrofotometria com a utilização do aparelho GeneQuant pro e para determinar a especificidade e titulação da IgY anti-HAV nas gemas foi realizado um teste imunoenzimático. Para isto, foi utilizada a IgY purificada dos ovos nas semanas 1, 5, 9, 13 e 16. O ensaio de ELISA utilizou o kit comercial BioKit ELISA anti-HAV que utiliza um ensaio imunoenzimático competitivo aonde os anticorpos presentes na amostra diluída no fator 10X competem com um anticorpo comercial conjugado com peroxidase pelo antígeno capturado na placa.

3.8. Produção do conjugado anti HAV

A imunoglobulina Y purificada foi conjugada com a peroxidase para a sua utilização no ensaio imunoenzimático de ELISA anti-HAV. A metodologia foi descrita por Nakane e colaboradores (1974) e modificada por Camargo e colaboradores (1987). Sua produção consiste na passagem em três colunas de Sephadex G-25 (Figura 3.6.).

Materiais

- Horseradish peroxidase (SIGMA, Alemanha)
- Metaperiodato de Sódio (0,1 M)
- Coluna de Sephadex G-25 (PD10) (Amersham Pharmacy Biotech)
- Tampão Acetato de Sódio (1 mM, pH 4,4)
- Tampão Carbonato (10 mM e 0,2 M, pH 9,5)
- Borohidrato de Sódio (0,1 M) (SIGMA, Alemanha)
- Tampão Fosfato Salina (PBS, pH 7,2)

Método

Antes de iniciar a conjugação, as três colunas Sephadex G-25 foram equilibradas com o mesmo volume (35 mL) dos tampões acetato de sódio (1mM), carbonato (0,01M) e PBS. Em seguida, houve a dissolução de 4 mg de peroxidase em 1 mL de água destilada. Na solução de peroxidase foram adicionados 0,2 mL de metaperiodato de sódio e a solução sofreu agitação

constante por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a solução de peroxidase e metaperiodato foi filtrada na primeira coluna, que havia sido equilibrada previamente com tampão acetato de sódio, de onde se desprezou o volume de 3,5 mL (volume do leito da coluna) e se retirou 1,5 mL da solução filtrada. Em seguida, o pH da mistura de peroxidase e metaperiodato foi ajustado para pH 9,4 com tampão carbonato 0,2 M. A solução contendo a IgY foi filtrada em outra coluna e equilibrada com tampão carbonato (10 mM) de onde se desprezou 3,5 mL e se coletou 1,5 mL do filtrado.

Para a conjugação, 1,5 mL do filtrado de IgY e 1,5 mL de peroxidase foram agitados constantemente com o agitador por 2 horas com a adição lenta de 0,1 mL de solução de borohidrato de sódio (0,1 M). A solução foi incubada em agitação constante por mais 2 horas a 4 °C e filtrada em uma terceira coluna contendo tampão fosfato salina, de onde foram desprezados 3,5 mL do volume do leito de coluna e coletados 3,0 mL do conjugado final. O conjugado foi estocado a temperatura de -20 °C e em solução de PBS/Glicerol (v/v) em uma diluição 1:10.

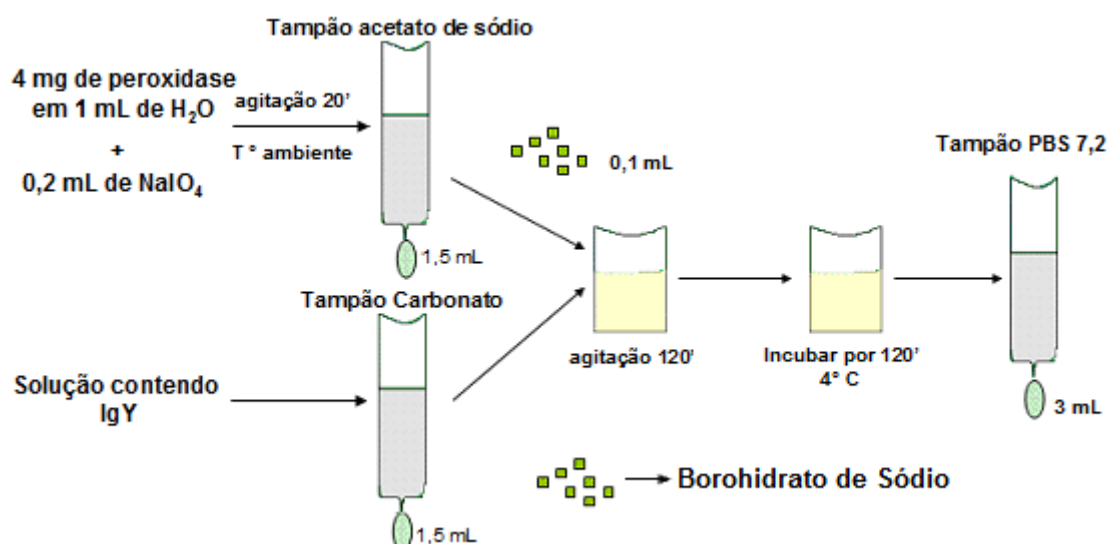


Figura 3.6. Esquema da conjugação da imunoglobulina Y com a peroxidase (Fonte: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC/Fiocruz).

3.9. Caracterização da IgY por SDS-PAGE e Western Blotting

3.9.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi efetuada para a visualização da ocorrência de imunoglobulina Y na gema dos ovos das galinhas imunizadas. O SDS-PAGE foi realizado com a utilização do sistema da Bio Rad® Mini gel.

Materiais

- Gel de corrida 10% (Acrilamida/Bisacrilamida 30%; Tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; SDS 10%; Persulfato de amônio 10%;TEMED)
- Gel de Empilhamento 10% (Acrilamida/Bisacrilamida 30%; Tampão Tris-HCl 1,0M, pH 6,8; SDS 10%; Persulfato de amônio 10%; TEMED)
- Brilliant Blue R (10 mg/mL)
- Solução descorante
- Solução de secagem do gel
- Cuba de corrida de eletroforese
- Tampão da amostra
- Tampão Tris-Glicina 1X
- Peso Molecular Bench mark

Método

O gel de corrida foi aplicado entre duas placas de vidro e polimerizado à temperatura ambiente por 1 hora. Após a polimerização do gel de corrida foi adicionado sobre este o gel de empilhamento. Nesse intervalo a solução corante Brilliant Blue R (10 mg/mL), a descorante e a de secagem do gel foram feitas. Com os géis polimerizados, estes foram presos à cuba de corrida. À cuba foi adicionado o Tampão Tris-Glicina 1X até cobrir o gel. As amostras da gema dos ovos foram diluídas 1:2 com o tampão da amostra e desnaturadas a 95°C por 4 minutos. As amostras e o peso molecular foram aplicados em seus respectivos poços e iniciada a corrida. A corrida foi ajustada para 150V por 80 minutos. Ao final da corrida, o gel foi retirado delicadamente e incubado por 30 minutos na solução corante e 30 minutos na solução descorante e visualizado.

3.9.2. Western Blotting

O Western Blotting visou evidenciar a presença de IgY anti-HAV, na gema dos ovos, pela sua ligação ao antígeno de Hepatite A. Para isso, foi adicionado o HAV em um gel de eletroforese, esse gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e à membrana foi adicionada a gema purificada das galinhas imunizadas. Para a visualização da ligação foi adicionada IgG anti-IgY de coelho e proteína A conjugada com peroxidase.

Materiais

- Horseradish peroxidase (SIGMA, Alemanha)
- Gel Bis-Tris 12%
- Corante comassie Blue
- Membrana de nitrocelulose
- Tampão de transferência do Western
- PBS-Tween 0,05% (PBS-T)
- Solução de leite em pó
- IgY de cada grupo (I-V)
- IgG de coelho anti-IgY (Sigma, Steinhein-Germany)
- Proteína A (Sigma, St Louis/USA)
- PBS
- 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro
- CoCl_2

Método

O vírus da Hepatite A foi colocado no gel Bis-Tris 12% e este foi submetido a eletroforese a 200 V por 40 minutos até a chegada do corante ao fundo. Os géis foram corados com Comassie Blue para visualizar as proteínas. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose no tampão de transferência do Western e submetidas a eletroforese a 100 V por 120 minutos. Em seguida, a membrana foi bloqueada com PBS-T 0,05% e solução de leite em pó 5% por 18 à 24 horas à temperatura ambiente com agitação constante no agitador e, então, lavada três

vezes (5 minutos por lavagem) em 200 mL de PBS-Tween 0,05%. A membrana foi incubada com IgY diluída 1:5000 em PBS-Tween 0,05% e em solução de leite em pó 5%, de cada grupo do estudo em questão (I-V) sendo incubada a 37 °C por quatro horas com agitação constante. Após a incubação, a membrana foi lavada como descrito anteriormente. Após a lavagem, IgG anti-IgY de coelho (Sigma, Steinhein-Germany) diluída a 1:5000 em PBS-T 0,05% foi adicionada à membrana, e a mesma foi incubada por 37°C durante 1 hora. A membrana foi lavada e a ela foi adicionada a proteína A (Sigma, St Louis/USA) conjugada com peroxidase diluída a 1:500 in PBS-T 0,05%. Houve uma incubação à 37 °C por 1 hora com agitação constante, seguida por uma lavagem final, três vezes com PBS-T e três vezes com PBS. As bandas foram reveladas utilizando 5mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto em 20 microlitros de peroxidase e 100 microlitros de CoCl_2 em 10mL de PBS. A reação foi interrompida pela adição de excesso de água destilada.

3.10. Neutralização *In vitro* do HAV pela IgY anti-HAV

Diluições do anticorpo IgY anti-HAV foram adicionadas ao HAV para avaliar a especificidade e a diluição máxima em que a IgY anti-HAV conseguiria inibir a replicação do HAV em cultura celular.

Materiais

- Imunoglobulina Y anti-HAV
- Vírus da Hepatite A (Cepa HAF-203)
- Cultura celular FRhK-4
- Kit de PCR em tempo real

Método

Inicialmente, as amostras de IgY anti-HAV diluídas (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10000) foram incubadas com 10^7 cópias/mL de HAV a 37°C por 1 hora. Depois, o inóculo ao qual foi anteriormente adaptado para cultura de células FRhK-4 foi adicionado à monocamada de FRhK-4 e mantido durante 10 dias a 37°C com 2% de CO_2 . A replicação do HAV foi estimada por técnica

de PCR real time quantitativo para a detecção de RNA negativo intermediário, como descrito por de Paula e colaboradores (de Paula *et al.*, 2009).

3.11. Avaliação da IgY anti-HAV como conjugado e captura

Para avaliação da IgY anti-HAV como anticorpo conjugado e anticorpo de captura de ensaios imunoenzimáticos (EIE) foram realizados ensaios imunoenzimáticos diretos desenvolvidos no laboratório (in house) para detecção do antígeno de HAV (HAVAg). Através da melhor discriminação entre as densidades óticas dos controles positivos (vírus) e negativos (PBS) foi possível estabelecer a eficiência do método utilizado para a produção de anticorpos IgY anti-HAV.

Materiais

- Microplacas de poliestireno de 96 orifícios (Maxisorp, Estados Unidos)
- Imunoglobulina IgY anti-HAV
- Tampão Fosfato Salina + Tween 20 (PBST)
- Tampão de bloqueio (PBST + BSA 5%)
- Vírus da Hepatite A (Cepa HAF-203)
- Imunoglobulina IgY anti-HAV conjugada com peroxidase
- TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) (Sigma, Estados Unidos)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Método

Microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura (imunoglobulina Y anti-HAV) diluídas 1:1000 em PBS e incubadas a 4°C por 18 horas. Após esse tempo, a placa foi lavada 5 vezes com 220 µL de PBST e, em seguida, adicionados a ela 200 µL do tampão de bloqueio e realizada uma nova incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Ao término da segunda incubação, os poços foram lavados com 220 µL de PBST e a eles foi adicionado o vírus da Hepatite A diluído 1:2 em PBS. Seguida de nova incubação a 37°C por 1 hora. Após essa incubação houve mais uma lavagem com tampão PBST e adição do conjugado em duplicatas produzidas a partir da

IgY nas diluições: 1:100, 1:250, 1:1000 e 1:2000. Depois da adição do conjugado, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Após essa incubação, a microplaca foi lavada como descrito anteriormente e a ela foi adicionado 100 µL do cromógeno (TMB), sendo incubada durante 10 minutos. A reação foi interrompida com 100 µL de ácido sulfúrico e sua absorbância estabelecida por espectrofotometria (450 nm).

3.12. Padronização do teste para detecção de imunoglobulinas totais anti-HAV

Para avaliar a melhor concentração e ação da IgY anti-HAV como anticorpo de captura na placa e anticorpo conjugado com peroxidase para detecção de anticorpos totais anti-HAV, foi realizado um ensaio imunoenzimático competitivo onde o IgY anti-HAV conjugado competiu com imunoglobulinas anti-HAV das amostras. Para esta avaliação se verificou a melhor discriminação entre as D.O.s das amostras positivas e negativas para imunoglobulinas anti-HAV.

Materiais

- Microplacas de poliestireno 96 orifícios (Maxisorp, Estados Unidos)
- Imunoglobulina IgY anti-HAV
- Tampão Fosfato Salina + Tween 20 (PBST)
- Tampão de bloqueio (PBST + BSA 5%)
- Vírus da Hepatite A (Cepa HAF-203)
- Imunoglobulina IgY anti-HAV conjugada com peroxidase
- TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) (Sigma, Estados Unidos)
- Ácido sulfúrico
- Amostras positivas para IgG anti-HAV (de acordo com o kit comercial Biokit Elisa anti-HAV)
- Amostras negativas para IgG anti-HAV (de acordo com o kit comercial Biokit Elisa anti-HAV)

Método

Microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura (imunoglobulina Y anti-HAV) 1:1000 em PBS e incubadas a 4°C por 18 horas. Ao término da primeira incubação, os poços foram lavados 5 vezes com 220 µL de PBST e a eles foram adicionados 50 µL do vírus da Hepatite A diluído 1:2 e 50 µL das amostras positivas e negativas nas diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:2000. Em seguida foi realizada uma segunda incubação por 1 hora a 37°C. Após essa incubação houve mais uma lavagem com tampão PBST e adição de 100µL do conjugado produzido a partir da IgY nas diluições: 1:100, 1:250, 1:1000 e 1:2000. Depois da adição do conjugado a microplaca foi incubada por 1 hora a 37°C. Em seguida a microplaca foi lavada como descrito acima e a ela foi adicionado o cromógeno (TMB) para a incubação durante 10 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico e sua absorbância estabelecida por espectrofotometria.

Após a definição das melhores diluições da amostra e do conjugado foi realizado um ensaio com a etapa de bloqueio. Nesse ensaio microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura (imunoglobulina IgY anti-HAV) diluídas 1:1000 em PBS e incubadas a 4°C por 18 horas. Após esse tempo, a placa foi lavada 5 vezes com 220 µL de PBS-Tween (PBST), a ela adicionados 200 µL do tampão de bloqueio (PBST + BSA 5%) e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Ao término da segunda incubação, os poços foram lavados 5 vezes com 220 µL de PBST e a eles foram adicionados 50 µL do vírus da Hepatite A diluído 1:2 e 50 µL de cada amostra positiva e negativa nas diluições 1:10 e 1:100. Em seguida, foi feita uma terceira incubação por 1 hora a 37°C. Após essa incubação a placa foi lavada 5 vezes tampão PBST e a ela se adicionou 100 µL do conjugado produzido a partir da IgY nas diluições: 1:250, 1:500 e 1:1000. Depois da adição do conjugado a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após a incubação, a microplaca foi lavada e a ela foi adicionado o cromógeno (TMB) e, então, incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi parada com ácido sulfúrico e sua absorbância estabelecida por espectrofotometria (450 nm).

3.13. População de estudo

As amostras utilizadas nesse trabalho para a avaliação dos ensaios imunoenzimáticos são amostras de voluntários com sorologia positiva (100 amostras) ou negativa (100 amostras) confirmados por ensaios imunoenzimáticos competitivos que utilizam IgG como captura e conjugado. Essas amostras foram retiradas de um surto que ocorreu na cidade de três rios no estado do Rio de Janeiro.

3.14. Detecção de anticorpos anti-HAV totais utilizando IgY como captura e conjugado

Após a detecção da melhor diluição das amostras e do conjugado, um painel de soros contendo 200 amostras em duplicata, 100 amostras de pacientes com sorologia positiva e 100 amostras para sorologia negativa para hepatite A foi avaliado para detecção de anticorpos totais anti-HAV, utilizando a IgY anti-HAV como captura e conjugado, no ensaio competitivo de ELISA descrito no tópico 3.12.

3.15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os dados foram demonstrados como a média \pm o desvio médio (DM) e níveis de significância foram avaliados utilizando ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes como nível de $p < 0.05$.

Para a avaliação do novo ensaio competitivo de ELISA IgY foi utilizado o programa MedCalc versão 9.3.9.0. O programa avaliou alguns parâmetros necessários para o controle de qualidade do teste:

- Especificidade: Proporção de todos os indivíduos sem a doença que apresentam resultados negativos quando o teste em particular é utilizado. A especificidade é calculada como o número de verdadeiros resultados negativos dividido pelo número de todos os indivíduos sem a doença.

Especificidade = $\frac{\text{Verdadeiro negativo}}{\text{Falso positivo} + \text{Verdadeiro negativo}}$
--

- Sensibilidade: Proporção de todos os pacientes com a doença que apresentam resultados positivos quando o teste em particular é utilizado. É calculada pelo número de verdadeiros positivos dividido pelo número de todos os pacientes com a doença.

Sensibilidade = $\frac{\text{Verdadeiro positivo}}{\text{Falso negativo} + \text{Verdadeiro positivo}}$

- Likelihood ratio: Indica quantas vezes o resultado de um teste diagnóstico é capaz de mudar a probabilidade de se ter uma doença. Esse valor é calculado tanto para resultados positivos que é a probabilidade de confirmar a doença, quanto para resultados negativos que é a probabilidade de excluir a doença. Quanto maior ou menor o likelihood ratio positivo ou negativo mais poderoso é o teste em termos diagnósticos.

Likelihood ratio positivo = $\frac{\text{Sensibilidade}}{(1 - \text{Especificidade})}$
--

Likelihood ratio negativo = $\frac{(1 - \text{Sensibilidade})}{\text{Especificidade}}$
--

- Valores preditivos: Definido como a precisão de um teste prever uma doença. Classificado em valor preditivo positivo (número de resultados verdadeiro- positivos dividido pelo número de todos os resultados positivos do teste) e valor preditivo negativo (número de resultados verdadeiro-negativos dividido pelo número de todos os resultados negativos do teste).

Valor Preditivo Positivo = $\frac{\text{Verdadeiro positivo}}{\text{Falso positivo} + \text{Verdadeiro positivo}}$
--

Valor Preditivo Negativo = $\frac{\text{Verdadeiro negativo}}{\text{Falso negativo} + \text{Verdadeiro negativo}}$
--

- Curva ROC: Descrição gráfica do desempenho de um teste representado pela relação entre a taxa de verdadeiro-positivos e a taxa de falso-positivos. Representa a precisão intrínseca do teste, e é ideal para a comparação de testes. A precisão global de um teste pode ser descrita como a área sobre a curva ROC.

- Eficiência: Relação entre o número de resultados corretos no teste e o total de indivíduos testados (N), isto é, a proporção de diagnósticos corretos.

$\text{Eficiência} = \frac{\text{Verdadeiro positivo} + \text{Verdadeiro negativo}}{\text{Total de indivíduos testados}}$

4. Resultados

4.1. Propagação e Quantificação das partículas virais

O vírus da Hepatite A (Cepa HAF-203) foi quantificado por PCR em tempo real após o cultivo celular, onde obtivemos $1,69 \times 10^6$ virions. Esse vírus foi utilizado para imunização dos animais, teste de neutralização e em ensaios imunoenzimáticos.

4.2. Efeitos da imunização nas galinhas

Todas as galinhas imunizadas demonstraram uma condição clínica saudável durante o experimento. Os locais de inoculação não trouxeram desconforto ou dano tecidual às galinhas. Para investigar a influência do estresse ou a toxicidade dos adjuvantes usados na imunização, as pesagens das galinhas foram realizadas e comparadas entre cada grupo durante o experimento. O resultado da pesagem foi encontrado pela média do peso das galinhas de cada grupo e foram feitas quatro pesagens, cada uma com um mês de intervalo à partir da primeira imunização. Na quadro 4.1 está apresentada a média das pesagens e do desvio padrão durante o experimento.

Quadro 4.1. Média do peso das galinhas e do desvio padrão por grupos

Grupos Pesagem	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo 5
1ª pesagem (\pm DP)	184,75 g (20.4)	181,25 g (26.8)	161 g (05.9)	174,5 g (26.6)	165,5 g (03.7)
2ª pesagem (\pm DP)	682,5 g (33.7)	670 g (63.7)	638,75 g (77.9)	583,75 g (87.2)	616,65 g (55.3)
3ª pesagem (\pm DP)	1430 g (92.0)	1508 g (135.3)	1462,5 g (108.0)	1333,75 g (176.0)	1193 g (66.5)
4ª pesagem (\pm DP)	1748,75 g (121,2)	1760 g (289,1)	1817,5 g (178,3)	1676,25 g (233,7)	1543 g (15,3)

Nenhuma anormalidade em relação ao peso foi observada no desenvolvimento das galinhas durante o período de imunização (Gráfico 4.1).

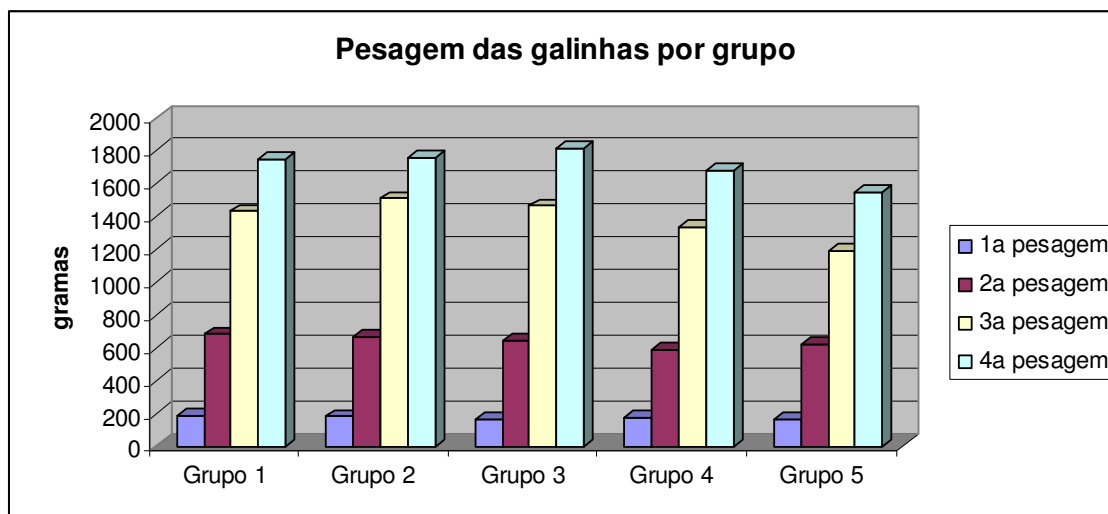


Gráfico 4.1. Peso (g) das galinhas dos cinco grupos em cada pesagem. As pesagens foram realizadas a cada mês após a 1ª imunização

Para avaliar a presença de IgY anti-HAV no soro das galinhas imunizadas, foram realizadas três coletas de sangue com um intervalo de 30 dias entre cada uma. O soro das galinhas foi titulado e foi verificado se as imunizações provocaram uma resposta imune contra a hepatite A ao produzir IgY anti-HAV. Nestes ensaios, o soro foi titulado para estimar a concentração de anticorpos específicos contra o HAV. Na primeira sorologia todos os grupos apresentaram resultado negativo, não sendo encontrado nenhum título de IgY anti-HAV. A partir da segunda coleta de sangue, já se encontrou positividade para anticorpos IgY anti-HAV em todos os grupos, exceto no grupo 5 que sofreu imunização com a IFA. Na análise comparativa do título sérico de IgY anti-HAV entre os diferentes grupos, o maior título de anticorpo foi detectado nos grupos 3 e 4, 30 dias após a primeira imunização ($p < 0,001$). Nos dois meses seguintes, não foi detectado diferença estatística entre os grupos. O grupo 3 imunizado com HAV, CpG-ODN e IFA demonstrou a maior elevação dos anticorpos após as imunizações (Gráfico 4.2.)

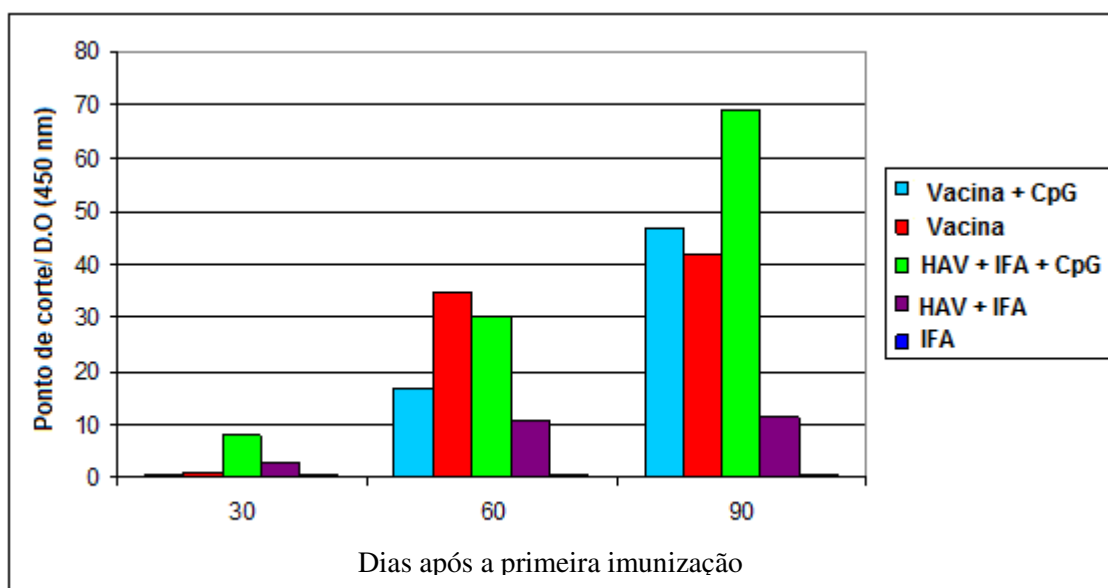


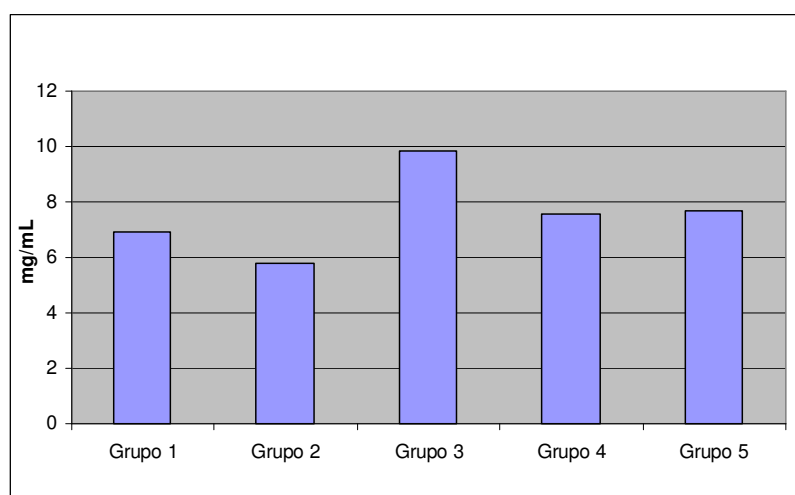
Gráfico 4.2. Resposta de anticorpos IgY nos diferentes grupos de galinhas imunizadas. Cada coluna no gráfico representa a média de valores da razão entre ponto de corte e densidade ótica de IgY anti-HAV encontrados no soro das galinhas imunizadas.

4.3. Avaliação da IgY anti-HAV purificada das gemas dos ovos

As galinhas produziram 1406 ovos em 16 semanas, o número de ovos coletados de cada grupo por semanas está apresentado no quadro 4.2. Após a purificação da IgY anti-HAV ensaios imunoenzimáticos foram realizados nas semanas 1, 5, 9, 13 e 16 após a postura dos ovos para calcular a concentração utilizando espectrofotometria. O gráfico 4.3 demonstra a média da concentração estimada de proteínas pela espectrofotometria de todos os grupos entre a 1ª semana e a 16ª semana após a postura dos ovos. A maior concentração de proteínas foi encontrada no grupo 3 com média de 9,827 mg/mL e a menor foi obtida no grupo 2 (inoculado somente com a vacina inativada) com média de 5,794 mg/mL. Como a pureza encontrada no protocolo realizado (Polson *et al.*, 1985) é de 89% a concentração acima foi ajustada para 8,7406 mg/mL de IgY no grupo 3 e foi encontrado 5,1566 mg/mL de IgY no grupo 2.

Quadro 4.2. Número de ovos coletados por semana

Semana	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Total
1	9	2	3	6	4	24
2	14	7	15	14	10	60
3	16	12	24	19	13	84
4	15	12	21	20	13	81
5	16	22	22	21	13	94
6	24	20	23	25	12	104
7	23	20	25	26	12	106
8	27	21	24	26	20	118
9	24	20	29	24	25	122
10	25	20	19	25	12	101
11	25	17	27	24	6	99
12	21	18	25	16	6	86
13	24	21	22	25	13	105
14	19	17	18	14	12	80
15	24	20	26	26	14	110
16	8	6	6	8	4	32
Total	314	255	329	319	189	1406

**Gráfico 4.3.** Média da concentração de IgY (mg/mL) encontrada em ovos das galinhas imunizadas.

Os títulos de IgY anti-HAV encontrados nas gemas de cada grupo foram obtidos pela técnica de ELISA durante as 16 semanas do estudo. O resultado do teste de ELISA demonstrou que todos os grupos inoculados com HAV ou vacina produziram anticorpos IgY anti-HAV, porém a maior concentração desses anticorpos foi encontrada no grupo 3 que apresentou uma titulação de 10^3 (Gráfico 4.4.).

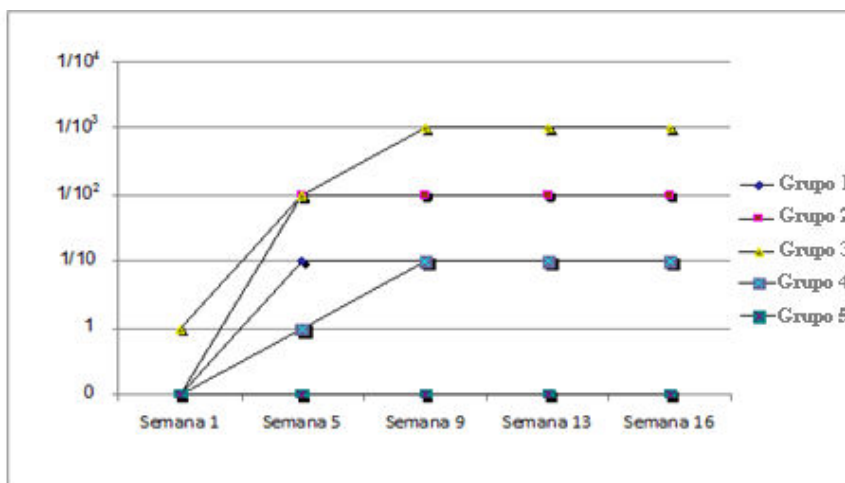


Gráfico 4.4. Títulos de IgY anti-HAV encontrados nas semanas 1, 5, 9, 13 e 16 após a postura dos ovos das galinhas imunizadas.

Os resultados da espectrofotometria e do teste de ELISA demonstram que a ação conjunta do adjuvante CpG-ODN com IFA teve uma maior eficiência na estimulação da resposta imune das galinhas. Sendo assim, a IgY do grupo 3 foi selecionada para ser testada como captura e conjugado do teste imunoenzimático de hepatite A.

4.4. Eletroforese

O SDS-PAGE foi realizado para confirmar o isolamento e purificação da IgY do ovo (Figura 4.1). O padrão eletroforético da filtração do gel encontrado estava de acordo com a IgY padrão (duas cadeias pesadas de 68 kDa e duas cadeias leves de 27 kDa).

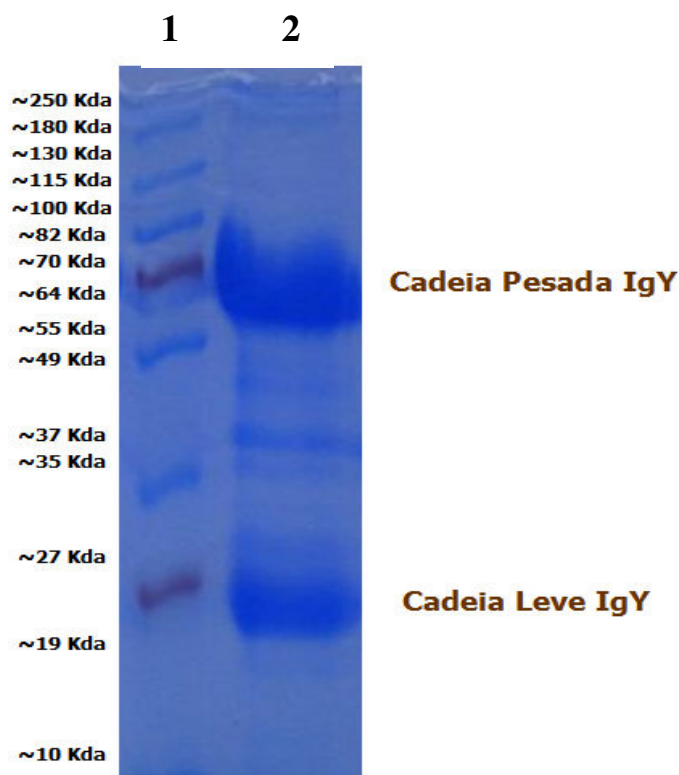


Figura 4.1. Gel de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE) da imunoglobulina purificada da gema dos ovos (IgY). Em cada linha foi colocada 20 μ L da proteína. A concentração da acrilamida foi de 12%. Linha 1 - peso molecular BenchmarkStaintm ; Linha 2- IgY

4.5. Western Blotting

A presença de IgY anti-HAV na gema dos ovos foi confirmada por Western Blotting (Figura 4.2).

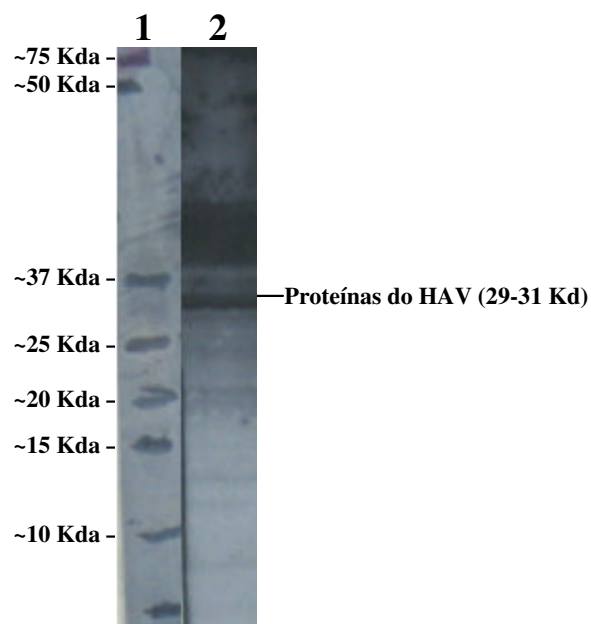


Figura 4.2. Análise do Western Blotting da IgY anti-HAV. O vírus da hepatite A foi incubado com IgY anti-HAV. Linha 1 – Peso molecular ; Linha 2- Proteínas do HAV.

4.6. Neutralização *In vitro* da hepatite A pela IgY

Foi observado que a IgY anti-HAV obtidas das gemas obteve sucesso ao bloquear a penetração do antígeno de HAV nas células FRhK-4. A neutralização do vírus ocorreu até a diluição de 1:100. Além disso, houve uma pequena replicação de HAV à partir das diluições de 1:1000 como descrito na quadro 4.3.

Quadro 4.3. Teste de neutralização de HAV com IgY anti-HAV e número de cópias do HAV replicativo detectado.

Diluição da IgY	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	Sem IgY
Título de neutralização com HAV	1:1	1:10	1:100	0	0	_____
Cópias de HAV/mL	ND	ND	ND	2.26	65.48	5.8×10^5

ND=Não detectado

4.7. Avaliação da IgY como conjugado e captura

Para a produção de um ensaio imunoenzimático a IgY anti-HAV foi avaliada em um teste de ELISA utilizando esse anticorpo como conjugado e captura da placa para determinar a melhor diluição em que a IgY anti-HAV poderia ser utilizada em um ensaio imunoenzimático.

Como resultado se verificou que houve uma melhor discriminação entre as D.O.s dos controles positivos (vírus) e dos controles negativos (PBS) quando o anticorpo IgY anti-HAV de captura estava em uma diluição de 1:1000 e a IgY anti-HAV conjugado com peroxidase estava em uma diluição de 1:1000 (figura 4.3.). O cálculo da média das D.O's do controle positivo foi igual a 1,1615 e do controle negativo foi igual a 0,292 com pouca cor de fundo no teste. Com o resultado positivo encontrado nos poços que continham o vírus, se verificou que os anticorpos encontrados nas gemas conseguiram se ligar ao vírus da Hepatite A (HAVAg) nos testes de padronização. Dessa maneira se demonstrou que o método utilizado para a produção de anticorpos IgY anti-HAV foi eficiente e que este anticorpo pode ser utilizado como insumo nos testes imunoenzimáticos para hepatite A.

		PBS	Vírus
		1	2
Diluição do conjugado	1:100	A 1,301	4
		B 1,452	3,803
	1:250	C 0,759	3,442
		D 0,597	3,342
	1:1000	E 0,277	1,319
		F 0,307	1,004
	1:2000	G 0,175	0,663
		H 0,294	0,712

Figura 4.3. Avaliação da melhor diluição do conjugado em um teste de IgY anti-HAV utilizando a IgY de captura em uma diluição de 1:1000. As diluições do conjugado foram de 1:100 (linhas A e B), 1:250 (linhas C e D), 1:1000 (linhas E e F) e 1:2000 (linhas G e H). Todas as diluições foram feitas em duplicata, tanto quando se coloca o PBS ou o vírus. O quadrado em vermelho demonstra a melhor diluição que discriminou entre as D.O.s.

4.8. Padronização do teste para detecção de imunoglobulinas totais anti-HAV

Após a avaliação da IgY anti-HAV como anticorpo de captura e conjugado para a sua utilização como insumo em testes imunoenzimáticos, foi realizada a padronização de um ensaio imunoenzimático competitivo produzido no laboratório para detecção de IgG anti-HAV. Inicialmente foi determinada a melhor diluição da amostra e a melhor diluição do conjugado, ou seja, aquelas diluições onde foi possível a melhor discriminação entre as D.O.s das amostras positivas para IgG anti-HAV e das amostras negativas para IgG anti-HAV.

Do teste imunoenzimático que não continha uma etapa de bloqueio com PBST + BSA 5% foram escolhidas as diluições de 1:100 e 1:10 das amostras e de 1:250 e 1:1000 do conjugado IgY anti-HAV (figura 4.4.).

		Diluição das amostras								
		1:2000		1:1000		1:100		1:10		
Diluição do conjugado		1	2	3	4	5	6	7	8	
	1:100	A	4	3,942	3,656	3,69	3,048	3,871	1,326	2,195
		B	3,84	3,777	3,715	3,911	2,924	3,709	1,258	1,881
	1:250	C	1,935	2,24	1,861	2,258	1,295	1,98	0,543	0,934
		D	1,884	2,498	2,182	2,286	1,372	2,068	0,517	0,938
	1:1000	E	1,086	1,054	0,827	1,011	0,646	0,935	0,288	0,493
		F	0,755	1,069	0,788	1,254	0,658	0,946	0,264	0,506
	1:200	G	0,466	0,452	0,354	0,496	0,318	0,402	0,138	0,283
	H	0,409	0,443	0,311	0,449	0,238	0,366	0,174	0,368	

Figura 4.4. Padronização do ensaio imunoenzimático competitivo “in-house” IgY anti-HAV. As colunas ímpares equivalem às amostras positivas para IgG anti-HAV e as colunas pares se referem às amostras negativas. Os quadrados em vermelho demonstram as diluições com as maiores discrepâncias entre as D.O.s das amostras positivas e negativas.

O passo seguinte foi realizar um ensaio imunoenzimático “in-house” competitiva IgY anti-HAV com a utilização do tampão de bloqueio (PBST + BSA 5%) que atua bloqueando os sítios de ligação da placa após o passo de captura da mesma. Nesse ensaio foram utilizadas as diluições de amostra e conjugado selecionadas anteriormente, ou seja, as diluições de 1:100 e 1:10 da amostra e de 1:1000 e 1:250 do conjugado. Como resultado foi observado que as diluições onde ocorreu a melhor discrepância entre as D.O.s positivas e negativas foram as de 1:100 do soro e 1:1000 da IgY anti-HAV conjugado (figura 4.5.).

		Sem bloqueio		Com bloqueio		
		1	2	3	4	
Diluição do conjugado	1:250	A	1,3	2,419	0,92	2,138
	1:500	B	1,262	2,258	0,855	2,061
	1:1000	C	0,732	1,357	0,53	1,214
	1:1000	D	0,78	1,409	0,489	1,197
	1:1000	E	0,497	0,95	0,318	0,874
	1:1000	F	0,459	0,873	0,363	0,809
	1:250	G	1,148	1,414	0,801	1,328
	1:250	H	-	-	-	-
				Diluição da amostra		
				1:100		
				1:10		

Figura 4.5. Padronização do ensaio imunoenzimático competitivo “in-house” IgY anti-HAV com a etapa de bloqueio. As colunas ímpares equivalem às amostras positivas para IgG anti-HAV e as colunas pares às amostras negativas. O quadrado em vermelho demonstra a melhor diluição com maiores discrepâncias entre as D.O.s das amostras positivas e negativas.

4.9. Detecção de anticorpos anti-HAV totais utilizando IgY como captura e conjugado

O teste imunoenzimático competitivo “in-house” foi realizado com um painel de amostras de pacientes positivos e negativos para imunoglobulinas totais anti-HAV. As amostras de soro utilizadas para padronização do teste foram testadas previamente para presença de anticorpos anti-HAV utilizando o teste Elisa comercial Biokit, o qual foi considerado como padrão ouro para comparação com os resultados obtidos no teste “in house” com IgY anti-HAV.

No programa MedCalc versão 9.3.9.0 foi realizada a análise estatística do ensaio. Os resultados foram obtidos de acordo com o valor de corte com maior precisão (mínimo de falsos negativos e falsos positivos) obtidos pela análise da curva ROC. A curva ROC foi utilizada para avaliar o desempenho da IgY anti-HAV no ensaio imunoenzimático “in house” para detecção da hepatite

A, pois a curva ROC constrói-se usando todos os valores possíveis de valor de corte com os correspondentes valores de sensibilidade e especificidade. E nos permite comparar dois testes diferentes e selecionar um valor ótimo de ponto de corte para um teste.

O melhor valor de ponto de corte indicado pela curva ROC foi de 0,8326. (figura 4.6) Utilizando este valor de corte, foram obtidas 21 amostras falso negativas, 16 amostras falso positivas, 84 amostras verdadeiro negativas e 79 amostras verdadeiro positivas. Dentre os valores obtidos a especificidade foi de 79% e a sensibilidade obtida foi de 84%. O “likelihood ratio” positivo (LR+) teve como resultado 4,00 e o negativo (LR-) foi de 0,20. Já como valor preditivo positivo (VPP+) o resultado foi de 80% e o negativo (VPP-) foi de 83,2%. Além dos resultados obtidos pelo programa MedCalc, a eficiência do ensaio foi calculada. O teste apresentou uma eficiência de 81,5% (Quadro 4.4.)

Quadro 4.4. Valores dos parâmetros de validação do teste imunoenzimático utilizando IgY anti-HAV

Valores dos parâmetros de validação	
Especificidade	79%
Sensibilidade	84%
Likelihood ratio positivo	4,00
Likelihood ratio negativo	0,20
Valor preditivo positivo	80%
Valor preditivo negativo	83,2%
Eficiência	81,5%

Segue abaixo a curva ROC com a sensibilidade e especificidade (figura 4.5.).

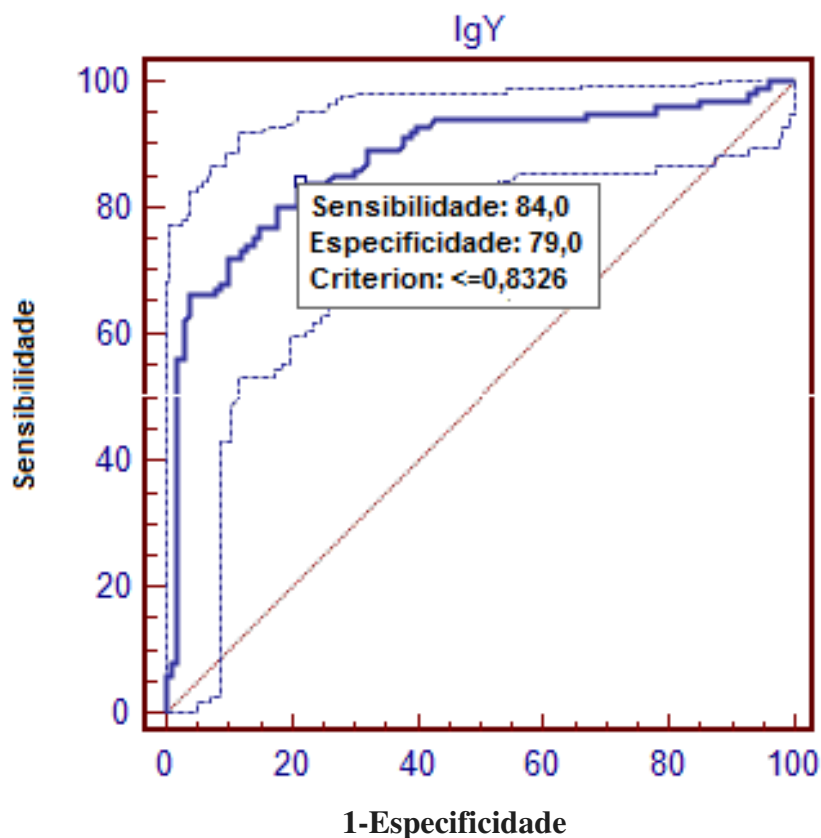


Figura 4.6. Curva ROC demonstrando a especificidade e sensibilidade do ensaio imunoenzimático “in-house” IgY anti-HAV

5. Discussão

5.1. Produção de IgY anti-HAV

A utilização de animais de laboratório é um tema polêmico devido ao desconforto em relação ao bem estar desses seres. Normalmente, os animais usados para fins de pesquisa ou tecnologia tendem a sofrer com a utilização de técnicas invasivas que podem causar danos teciduais ou enfermidades posteriores. Há uma grande discussão sobre a utilização de animais em laboratório, sendo preconizada a utilização de procedimentos que visam minimizar a dor e sofrimento do animal ou a substituição de protocolos que utilizam cobaias por métodos alternativos, como a utilização de cultura celular ou de tecidos, sistemas *in-vitro* e modelos matemáticos (definição de variáveis e testes de teorias, que reduzem o custo desses experimentos, tornando-os mais eficazes) (Morales, 2008). Nem sempre essa substituição é satisfatória e pode ocasionar menor taxa de positividade nos resultados dos experimentos, maior tempo necessário para a realização do experimento ou aumento dos custos. Quando os métodos alternativos são utilizados na produção de imunobiológicos, esses inconvenientes tendem a ser maximizados, pois muitas vezes a produção desses insumos deve ser feita no menor tempo possível em ocorrência de uma possível emergência ou surto de doenças. Se a produção do imunobiológico for mais demorada o resultado pode ser o aumento no número de enfermidades e mortes.

Para a produção de ensaios imunoenzimáticos são utilizadas imunoglobulinas de mamíferos. Quando um animal é utilizado, inicialmente sofre a inoculação do antígeno e após a inoculação há a formação de imunoglobulinas contra o antígeno inoculado. Após a formação das imunoglobulinas, estas são coletadas do animal e purificadas. Além disso, para avaliação do título sorológico dessas imunoglobulinas, o animal precisa ser ferido e sangrado várias vezes. Essa prática traz ao animal dano tecidual e sofrimento, pois constantemente o animal tem que ser ferido, tanto para a coleta de imunoglobulinas quanto para a avaliação do título sorológico desta (Schade *et al.*, 2005).

Uma alternativa que leva em consideração o sofrimento animal e está de acordo com a utilização de técnicas alternativas é a chamada tecnologia da imunoglobulina Y. A tecnologia da imunoglobulina Y utiliza imunoglobulinas produzidas por aves e passadas para seus ovos. A retirada desses anticorpos ocorre de maneira passiva, pelos ovos das galinhas, e, por isso, não trazem nenhum sofrimento ao animal (Schade *et al.*, 2005).

Com isso em mente, o presente trabalho visou produzir anticorpos que futuramente possam ser utilizados na indústria e na pesquisa à partir de galinhas imunizadas. A coleta desses anticorpos não trazem sofrimento ao animal, além de ter outras vantagens, como o baixo custo e não se ligar ao sistema complemento do mamífero.

Inicialmente, foi avaliada a produção da IgY anti-HAV e seu rendimento como imunobiológico. O ensaio se baseou na imunização das galinhas poedeiras para produção de IgY anti-HAV nas gemas dos ovos. Para evitar uma baixa produção de ovos após cada imunização por causa do estresse causado pelo procedimento da imunização (Levesque *et al.*, 2007), a primeira imunização ocorreu somente quando as galinhas estavam com 14 dias de vida, e a última ocorreu 30 dias antes de começar a postura dos ovos. Esse fato possibilitou que o título de IgY anti-HAV fosse transferido lentamente para o soro da gema com o maior título encontrado na 9^a semana como descrito em 1983 (Loeken *et al.*, 1983). As galinhas que foram imunizadas com HAV e com a IFA, com ou sem CpG-ODN, exibiram em seu soro uma resposta mais rápida para o HAV em comparação ao IFA após a primeira imunização. Depois da segunda imunização todos os grupos tiveram uma resposta similar em positividade aos títulos anti-HAV. Os grupos imunizados pela vacina (grupo 1: HAV inativado com CPG-ODN e grupo 2: HAV inativado) também apresentaram um alto título de anticorpos em 90 dias após a primeira imunização, o que confirma que a vacina comercial também pode ser útil na produção de IgY anti-HAV.

Na transferência da IgY para a gema dos ovos, as galinhas do grupo 3 (HAV + CpG + IFA) demonstraram uma transferência precoce e logo na primeira semana após a oviposição foi possível detectar IgY anti-HAV nas gemas. A adição de apenas IFA (adjuvante incompleto de freünd) não resultou em aumento dos títulos de IgY anti-HAV na gema ($p > 0.05$). Foi observado que

o grupo inoculado com a IFA e o adjuvante CpG-ODN (grupo 3) demonstrou os maiores títulos de IgY, apesar dos títulos dos anticorpos variarem de acordo com a formulação do inóculo utilizado para cada imunização a quantidade de anticorpos produzidos foi alta. Cada grupo colocou em média 280 ovos em quatro meses e cada gema dos ovos conteve de 100 à 150 mg de anticorpos de IgY. Isso pode resultar em 28–42 g de IgY por ano para cada galinha (Mine *et al.*, 2002, Pauly *et al.*, 2009). Os anticorpos IgY anti-HAV representaram entre 2% e 10% do total de IgY encontrado nos ovos (Schade *et al.*, 1994). No grupo 3, a deposição de IgY anti-HAV nos ovos chegou a um primeiro pico na nona semana e se estabilizou até a 16^a semana após o começo da postura dos ovos. Além disso, nesse grupo foi encontrado um aumento no título de 10^2 de IgY anti-HAV por todas semanas quando comparado com o uso de apenas IFA e HAV.

A média específica da concentração de IgY anti-HAV na gema dos ovos das galinhas do grupo 3 (inoculadas com HAV + IFA + CpG-ODN) sempre foi a mais alta por todas as semanas de oviposição ao se comparar com os ovos de outros grupos. Levesque já havia descrito níveis altos de anticorpos específicos contidos na gema dos ovos ao se utilizar mais de um adjuvante (Levesque *et al.*, 2007). No caso do grupo 3 esse aumento se deu pois a IFA e o CpG-ODN tem ações distintas como adjuvantes. A IFA tem como ação o prolongamento da presença do antígeno no local da injeção e a promoção de um transporte mais eficaz dos antígenos para o sistema linfático e para os pulmões onde ocorre um acúmulo de células inflamatórias, além disso, ela também tem a capacidade de induzir processos inflamatórios, aumentando o infiltrado de células inflamatórias e a capacidade de estimular as funções das células apresentadoras de antígeno (APC), potencializando a resposta das células T específicas (Gupta *et al.*, 1993). Já as moléculas de CpG-ODN precisam ser internalizadas pelos leucócitos em endossomos que são maturados e fazem a ativação celular e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, após esse passo, o CpG-ODN se liga ao receptor Toll-like 9 que aumenta a geração da resposta imune inata e promove proteção do tipo Th1 em modelos animais (Vincent *et al.*, 2009, Zwirok *et al.*, 2008). Desse modo, o maior título de IgY anti-HAV observado no grupo 3 ocorreu pela diferença de atuação dos adjuvantes, potencializando a resposta imune das galinhas para a formação da

Imunoglobulina Y, aumentando tanto a sua concentração no soro quanto sua concentração na gema das galinhas. Esse aumento demonstra que o CpG-ODN teve uma atuação paralela na resposta imune contra a hepatite A quando as galinhas foram imunizadas.

Como adjuvante, o CpG pode ser utilizado em conjunto com vacinas antivirais para aumentar o nível sérico de imunoglobulina em uma vacinação passiva, pode ser utilizado também aumentando a resposta imune contra o câncer, no tratamento do asma ou outras doenças alérgicas (Zwioerek *et al.* 2008) e em qualquer estudo clínico que necessite de um adjuvante como reforço para o aumento e modulação da resposta imune. A utilização de CpG-ODN foi bastante importante para o aumento da produção de IgY anti-HAV tanto na gema quanto no soro das galinhas. A quantidade de IgY específica na gema dos ovos aumentou em relação ao tempo e se estabilizou, mesmo depois da imunização prolongada.

A IgY anti-HAV foi capaz de bloquear a atividade funcional do HAV *in-vitro* como mostrado no teste de neutralização, tornando-a uma alternativa para a terapia passiva. A imunização passiva com anticorpos monoclonais apresenta muitas vantagens sobre a vacinação: existe a possibilidade de tratamento de pessoas com fraca resposta à vacinas, tais como idosos, crianças jovens ou indivíduos imunocomprometidos, a imunização passiva pode ser o tratamento de escolha em situações em que uma proteção rápida é crucial, como um tratamento após a exposição (Beerli *et al.*, 2009). Além disso ela protege contra patógenos resistentes a antibióticos ou antivirais (Casadevall *et al.*, 2004). Várias terapias passivas utilizando imunoglobulinas G foram recomendadas para prevenção de patógenos ou estão em fase de testes como: hepatite A, hepatite B, sarampo, raiva, tétano, botulismo, varicela (Hemming, 2001), citomegalovírus (Adler *et al.*, 2008) e influenza H1N1 (Manicassamy *et al.*, 2009).

Através do ensaio imunoenzimático, Western Blotting e teste de neutralização *in vitro* foi provado que a IgY anti-HAV produzida é específica para hepatite A, é estável e bloqueia a atividade do HAV *in-vitro*. Além de todas as vantagens que a IgY produzida tem perante uma imunoglobulina produzida em mamíferos, é interessante também avaliar que a quantidade total que uma galinha pode chegar a produzir de IgY anti-HAV é de 28-42 gramas por ano na

gema de seus ovos. No caso do nosso método de produção de IgY anti-HAV foi encontrado no grupo 3 uma produção média de 8,7406 mg/mL, o que é maior do que o encontrado em média em coelhos (7,5 mg/mL). O título de IgY anti-HAV encontrado no grupo 3 e a especificidade com o HAV nos estimularam a testar a sua utilização em um ensaio imunoenzimático para a averiguação de presença de anticorpos humanos anti-HAV.

Os resultados encontrados na produção e purificação do IgY anti-HAV foram submetidos para publicação na J Virol Methods (anexo 2).

5.2. Padronização e avaliação do teste imunoenzimático de ELISA utilizando IgY anti-HAV como conjugado e captura

O diagnóstico da Hepatite A geralmente ocorre por testes imunoenzimáticos, mas o gasto para a sua produção é alto e o Brasil não possui um teste padronizado pelo governo, sendo necessária a compra de testes comerciais importados, o que aumenta ainda mais o custo do teste. A alternativa encontrada pelo presente trabalho é a utilização de anticorpos IgY anti-HAV produzidos a partir de gemas de galinhas poedeiras imunizadas que apresentam baixo custo de produção.

Para a padronização do teste ELISA IgY anti-HAV foi necessário a avaliação da capacidade do anticorpo em sua ligação ao vírus e em sua utilização na placa como anticorpo de captura, além de analisar a melhor diluição em que os anticorpos deveriam ser utilizados no teste imunoenzimático. A IgY apresentou bons resultados tanto na ligação do captura quanto no conjugado, o que permitiu o desenvolvimento do teste, podendo ser utilizado para detecção do HAV em um teste imunoenzimático na diluição de 1:1000 como conjugado e 1:1000 como captura, a mesma diluição encontrada no ELISA “*in-house*” que utiliza anticorpos humanos para detecção de anticorpos anti-HAV (Vítal *et al.*, 1991).

Em seguida, a IgY anti-HAV foi testada no ensaio imunoenzimático IgY anti-HAV competitivo, aonde a imunoglobulina Y deveria competir com as imunoglobulinas anti-HAV encontradas em uma amostra de soro positiva. O teste foi realizado em duas etapas: (1) sem a utilização do

tampão de bloqueio e (2) com a utilização do tampão de bloqueio. No primeiro ensaio, que não utilizou o tampão de bloqueio, se observou pouca diferença entre as D.O.s das amostras positivas e negativas, além da ocorrência de cor de fundo. A partir desse ensaio foram selecionadas as diluições que obtiveram as melhores discrepâncias entre as D.O.s de amostras positivas e negativas. As diluições de 1:10 e 1:100 das amostras e de 1:250 e 1:1000 do conjugado IgY anti-HAV foram utilizadas para avaliar o teste utilizando o bloqueio.

O bloqueio tem a função de bloquear os sítios de ligação da placa de poliestireno e com isso evitar o ruído. Com a diminuição da cor de fundo alguns resultados de amostras positivas não dão resultados falso negativos. Na etapa que utilizou a fase de bloqueio, foram utilizadas as diluições selecionadas pela etapa (1), ou seja, o ensaio sem a utilização do tampão de bloqueio. Utilizando o bloqueio, a melhor discrepância entre as D.O.s das amostras positivas e negativas com menor cor de fundo foi encontrada nas diluições de 1:100 do soro e 1:1000 da IgY anti-HAV conjugado e do captura. Essas foram as diluições de escolha no ensaio imunoenzimático competitivo ELISA anti-HAV, utilizando a IgY.

A diluição do conjugado geralmente utilizada de IgG em um teste “*in-house*” para detecção de imunoglobulinas anti-HAV totais em mamíferos é de 1:1000 no conjugado. O comportamento da IgY no ensaio IgY anti-HAV é semelhante ao de IgG, sendo necessária uma diluição de 1:1000 do anticorpo conjugado. Além disso, a quantidade de soro utilizada foi 10 vezes menor que a utilizada nos testes com IgG como captura e conjugado. Essa comparação demonstra que um ensaio utilizando IgY necessita de uma menor quantidade de amostra do que um de IgG.

A fim de avaliar a performance do teste, foram utilizadas 100 amostras positivas e 100 amostras negativas para anticorpos anti-HAV. A especificidade do ELISA “*in house*” utilizando a IgY foi de 79%, ou seja, entre os 100 indivíduos negativos, 79 indivíduos apresentaram resultados negativos. A sensibilidade foi de 84% e é a proporção de pacientes com a doença que apresentam resultados positivos. Em geral, para um teste imunoenzimático ser considerado muito bom tem que ser encontrada uma sensibilidade e especificidade acima de 90% (Camargo *et al.*, 1987, Nielsen, 1995). Baseado neste critério, tanto a sensibilidade quanto a especificidade tiveram resultados

considerados como razoáveis para o teste. O likelihood ratio indica quantas vezes o resultado de um teste diagnóstico é capaz de mudar a probabilidade de se ter uma doença. O likelihood ratio positivo teve como resultado 4,00 tendo um efeito moderado na probabilidade de confirmar a doença e o valor do likelihood ratio negativo de 0,20 também tem um efeito moderado na probabilidade de excluir a doença. Os valores preditivos são definidos como a precisão do teste em prever a doença. O valor preditivo positivo foi de 80% e o preditivo negativo foi de 83,2%. Os valores preditivos são considerados bons em prever a doença quando acima de 80%. A eficiência do teste, que é a proporção de diagnósticos corretos, foi de 81,5%, sendo considerada uma boa eficiência para um teste imunoenzimático. Como observado, todos os resultados estatísticos para a avaliação do teste imunoenzimático deram um resultado bom ou moderado para sua utilização como ensaio IgY anti-HAV (Crowther, 2000).

Os resultados encontrados podem ter sido influenciados por vários fatores. A purificação pelo polietileno glicol não exibe 100% de eficácia, sobrando resíduos de lipídios e outras proteínas encontradas na gema dos ovos. Essas proteínas e lipídios podem ter contribuído para um resultado falso-negativo da amostra, além disso as amostras de soro humano foram congeladas e descongeladas várias vezes. O que pode ter influenciado nos resultados encontrados. Algumas precauções devem ser seguidas para a utilização de amostras de soro em ensaios imunoenzimáticos, tais como o armazenamento das amostras à temperatura de -20 °C, a verificação diária da temperatura de estocagem, a realização de até 3 ciclos de congelamento/descongelamento e o excesso de agitação das amostras. Estes procedimentos são procedimentos importantes para evitar a desnaturação de proteínas e anticorpos. E no caso da agitação também há a produção de espuma que ocasiona a quebra das proteínas enriquecendo as bolhas com anticorpos que não estarão mais contidos no volume líquido que será utilizado no teste, diminuindo assim sua concentração (Crowther, 2000).

As amostras de soro humano neste trabalho eram provenientes de surtos de hepatite A. Essas amostras geralmente são coletadas no local do surto e transportadas para o laboratório, de onde são processadas no final do dia ou no dia seguinte. No presente trabalho foram encontrados 21 resultados

falso negativos e 16 resultados falso positivos. Os resultados falso negativos podem ter ocorrido por desnaturação das proteínas da amostra devido a sua agitação excessiva durante o transporte da amostra e/ou pelo congelamento/descongelamento das amostras. Essa desnaturação provoca aumento da cor de fundo e resultados falso negativos. Além disso, foi observado que vários ciclos de congelamento/descongelamento do HAV podem diminuir o título viral e por consequência diminuir a ligação dos anticorpos ao vírus, influenciando nos resultados encontrados. No ensaio imunoenzimático IgY anti-HAV, após a ligação do HAV aos anticorpos conjugados há uma etapa de lavagem, onde os anticorpos que não se ligam ao antígeno ou não conseguem encontrar antígeno para sua ligação, são removidos da placa, como não há a presença de anticorpos conjugados na placa, ao final do ensaio competitivo haverá uma diminuição da densidade ótica e ocorrerá um resultado falso positivo (Vital et al., 1991). Como o que pode ter ocorrido pela diminuição do título de anticorpos anti-HAV nas 16 amostras falso positivas encontradas. Na literatura, outros autores demonstraram a utilização da IgG anti-HAV nos testes de Elisa (Johnson et al., 2003, Juliarena et al., 2007, Sunwoo et al., 2006), porém os parâmetros de validação do teste não foram calculados.

Os resultados da análise estatística demonstraram que a IgY pode ser utilizada em ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-HAV, porém a estabilidade do vírus, a conservação das amostras biológicas e a purificação da IgY anti-HAV devem ser reavaliados, afim de aumentar a sensibilidade e especificidade do teste.

O ensaio de IgY anti-HAV pode ser uma boa alternativa para o diagnóstico da hepatite A no Brasil, pois apresenta menor custo, especificidade semelhante ao ensaio imunoenzimático comercial e utilização de gemas de ovos, reduzindo o sofrimento animal.

6. Conclusão

- O adjuvante CpG-ODN aumentou a produção de IgY anti-HAV em galinhas imunizadas com o antígeno e com a vacina;
- O grupo com a maior produção de IgY anti-HAV foi o grupo inoculado com HAV, CpG-ODN e IFA. Nesse grupo os dois adjuvantes atuaram paralelamente na produção de IgY anti-HAV aumentando sua produção;
- O teste de neutralização demonstrou que a IgY anti-HAV conseguiu inibir a replicação do HAV “in vitro” podendo ser futuramente ser utilizada como agente de imunização passiva contra hepatite A;
- A IgY anti-HAV foi satisfatoriamente conjugada com a peroxidase e pode ser utilizado como reagente em futuros testes de diagnóstico para Hepatite A.;
- A IgY anti-HAV é um insumo em potencial para ser utilizada como anticorpo de captura e ou conjugado em um ensaio imunoenzimático para diagnóstico do HAV;
- Os parâmetros de avaliação do ensaio mostraram que o ensaio imunoenzimático “in house” utilizando IgY anti-HAV teve bons resultados podendo ser futuramente utilizado para o diagnóstico da hepatite A;

Bibliografia

- Adler SP, Nigro G. The importance of cytomegalovirus-specific antibodies for the prevention of fetal cytomegalovirus infection or disease. *Herpes*. 2008 Nov;15(2):24-7.
- Amado LA, Villar LM, de Paula VS, *et al.* Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J Virol Methods*. 2008 Mar;148(1-2):74-80.
- Ambrosch F, Wiedermann G, André FE, *et al.* Comparison of HAV antibodies induced by vaccination, passive immunization, and natural infection. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins 1991:98-100.
- Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, *et al.* Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *Embo J*. 1993 Sep;12(9):3587-98.
- Asher LV, Binn LN, Mensing TL, *et al.* Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol*. 1995 Nov;47(3):260-8.
- Beerli RR, Bauer M, Schmitz N, *et al.* Prophylactic and therapeutic activity of fully human monoclonal antibodies directed against influenza A M2 protein. *Virol J*. 2009;6:224.
- Benson HN, Brumfield HP, Pomeroy BS. Requirement of avian C'1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol*. 1961 Nov;87:616-22.
- Bianco E, De Masi S, Mele A, *et al.* Effectiveness of immune globulins in preventing infectious hepatitis and hepatitis A: a systematic review. *Dig Liver Dis*. 2004 Dec;36(12):834-42.
- Bizanov G, Normantienê T, Jonauskienê I. Development of antibodies to Sendai virus in chickens and their isolation from yolk. *BIOLOGIJA*. 2006 2006(2):68-71.
- Blumer G. Infectious jaundice in the United States. *JAMA*. 1923;81:353-8.
- Boggs JD, Melnick JL, Conrad ME. Viral Hepatitis clinical and tissue culture studies. *JAMA*. 1970;214:1041-6.
- Bower WA, Nainan OV, Han X, *et al.* Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis*. 2000 Jul;182(1):12-7.

- Bradley DW, Maynard JE, Hindman SH, *et al.* Serodiagnosis of viral hepatitis A: detection of acute-phase immunoglobulin M anti-hepatitis A virus by radioimmunoassay. *J Clin Microbiol.* 1977 May;5(5):521-30.
- Braga WS, Borges FG, Barros Junior GM, *et al.* Prevalence of hepatitis A virus infection: the paradoxical example of isolated communities in the western Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 May-Jun;42(3):277-81.
- Brown EA, Day SP, Jansen RW, *et al.* The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol.* 1991 Nov;65(11):5828-38.
- Brundage SC, Fitzpatrick AN. Hepatitis A. *Am Fam Physician.* 2006 Jun 15;73(12):2162-8.
- Camargo IF, Gaspar AM, Yoshida CF. Comparative ELISA reagents for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987 Apr-Jun;82(2):181-7.
- Cameron JDS. Infective Hepatitis. *Quart J Med.* 1943;12:139-55.
- Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Sep;2(9):695-703.
- CDC. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 1999 Oct 1;48(RR-12):1-37.
- Chang HM, Ou-Yang RF, Chen YT, *et al.* Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J Agric Food Chem.* 1999 Jan;47(1):61-6.
- Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Quarterly Journal of Medicine.* 1912;6:1-29.
- Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, *et al.* Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol.* 1987 Jan;61(1):50-9.
- Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis.* 1989 Nov;160(5):887-90.
- Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferre V, *et al.* Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol.* 2003 Dec;84(Pt 12):3191-201.

- Cova L. DNA-designed avian IgY antibodies: novel tools for research, diagnostics and therapy. *J Clin Virol*. 2005 Dec;34 Suppl 1:S70-4.
- Crowther JR. Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases. *Methods in Molecular Biology: The ELISA guidebook*: Humana press 2000:424.
- Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):38-58.
- de Almeida CM, da Silva CL, Couto HP, *et al*. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon*. 2008 Aug 1;52(2):293-301.
- De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, *et al*. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res*. 2007 Mar;41(6):1169-76.
- de Paula VS, Perse AS, Amado LA, *et al*. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Oct;28(10):1167-76.
- Decker RH, Kosakowski SM, Vanderbilt AS, *et al*. Diagnosis of acute hepatitis A by HAVAB-M, a direct radioimmunoassay for IgM anti-HAV. *Am J Clin Pathol*. 1981 Aug;76(2):140-7.
- Dentinger CM. Emerging infections: hepatitis A. *Am J Nurs*. 2009 Aug;109(8):29-33.
- Drake ME, Ming C. Gamma globulin in epidemic hepatitis: comparative value of two dosage levels, apparently near the minimal effective level. *J Am Med Assoc*. 1954 Aug 7;155(15):1302-5.
- Favero MS, Maynard JE, Leger RT, *et al*. Guidelines for the care of patients hospitalized with viral hepatitis. *Ann Intern Med*. 1979 Dec;91(6):872-6.
- Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, *et al*. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*. 1998 Aug;72(8):6621-8.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973 Dec 7;182(116):1026-8.
- Fiore AE, Wasley A, Bell BP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2006 May 19;55(RR-7):1-23.

- Fischer GE, Thompson N, Chaves SS, *et al.* The epidemiology of hepatitis A virus infections in four Pacific Island nations, 1995-2008. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Sep;103(9):906-10.
- Frosner GG, Overby LR, Flehmig B, *et al.* Seroepidemiological investigation of patients and family contacts in an epidemic of hepatitis A. *J Med Virol.* 1977;1(3):163-73.
- Fu CY, Huang H, Wang XM, *et al.* Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. *J Virol Methods.* 2006 Apr;133(1):112-5.
- Fujibayashi T, Nakamura M, Tominaga A, *et al.* Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. Adherence and Biofilm Formation. *Jpn J Infect Dis.* 2009 Sep;62(5):337-42.
- Fujiyama S, Iino S, Odoh K, *et al.* Time course of hepatitis A virus antibody titer after active and passive immunization. *Hepatology.* 1992 Jun;15(6):983-8.
- Gaspar AM, Vitral CL, Yoshida CF, *et al.* Primary isolation of a Brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4). *Braz J Med Biol Res.* 1992;25(7):697-705.
- Gaspar AMC, Oliveira JM, Silva MLP, *et al.* Orally transmitted acute hepatitis in Rio de Janeiro, Brasil (1989-1995). In: Buisson Y, Coursaget P, Kane M, eds. *Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses: La Simarre* 1996:99-100.
- Gellis SS, Stokes Jr. J, Brother GM, *et al.* The use of human immune serum globulin (gamma globulin) in infectious (epidemic) hepatitis in the Mediterranean theater of operations. I. Studies on prophylaxis in two epidemics of infectious hepatitis. *JAMA.* 1945;128:1062-3.
- Guimaraes MC, Amaral LG, Rangel LB, *et al.* Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009 Sep-Oct;57(5):377-82.
- Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, *et al.* Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 1993;11(3):293-306.
- Gust ID, Coulepis AG, Feinstone SM, *et al.* Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology.* 1983;20(1):1-7.
- Hall WT, Madden DL, Mundon FK, *et al.* Protective effect of immune serum globulin (ISG) against hepatitis A infection in a natural epidemic. *Am J Epidemiol.* 1977 Jul;106(1):72-5.

- Hansen P, Scoble JA, Hanson B, *et al.* Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods*. 1998 Jun 1;215(1-2):1-7.
- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, *et al.* Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1993 Mar;57(3):450-4.
- Havens Jr. WP, Paul JR. Prevention of infectious hepatitis with gamma globulin. *JAMA*. 1945;129:270-2.
- Hemming VG. Use of intravenous immunoglobulins for prophylaxis or treatment of infectious diseases. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Sep;8(5):859-63.
- Hochel I, Viochna D, Skvor J, *et al.* Development of an indirect competitive ELISA for detection of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* O:23 in foods. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004;49(5):579-86.
- Hollinger FB. International symposium on active immunization against hepatitis A. Vienna, 27-29 January 1992. *Vaccine*. 1992;10 Suppl 1:S6-7.
- Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A Virus. *Fields* 2007:911-40.
- Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, *et al.* A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National Hepatitis A Investigation Team. *N Engl J Med*. 1999 Feb 25;340(8):595-602.
- Jansen RW, Siegl G, Lemon SW. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins 1991:58-62.
- Jaradat ZW, Marquardt RR. Studies on the stability of chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates and food materials. *Food and Agricultural Immunology*. 2000;12:263-72.
- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, *et al.* Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods*. 1981;46(1):63-8.
- Johnson AJ, Langevin S, Wolff KL, *et al.* Detection of anti-West Nile virus immunoglobulin M in chicken serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):2002-7.
- Juliarena M, Gutierrez S, Ceriani C. Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. *Vet Res Commun*. 2007 Jan;31(1):43-51.

- Kammila S, Das D, Bhatnagar PK, *et al.* A rapid point of care immunoswab assay for SARS-CoV detection. *J Virol Methods*. 2008 Sep;152(1-2):77-84.
- Kao HW, Ashcavai M, Redeker AG. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology*. 1984 Sep-Oct;4(5):933-6.
- Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, *et al.* Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo J*. 1996 Aug 15;15(16):4282-96.
- Kitaguchi K, Osada K, Horio F, *et al.* Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Feb 15;121(3-4):290-9.
- Kiyohara T, Ouchi Y, Hasegawa Y, *et al.* An in-house-anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay: evaluation and application to an HAV outbreak. *J Med Virol*. 2009 Sep;81(9):1513-6.
- Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. *Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1893;31:356-82.
- Koff RS. Hepatitis A. *Lancet*. 1998 May 30;351(9116):1643-9.
- Krieg AM. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 10;1489(1):107-16.
- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *Jama*. 1967 May 1;200(5):365-73.
- Kummer A, Li-Chan EC. Application of an ELISA-elution assay as a screening tool for dissociation of yolk antibody-antigen complexes. *J Immunol Methods*. 1998 Feb 1;211(1-2):125-37.
- Kuramoto E, Yano O, Kimura Y, *et al.* Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn J Cancer Res*. 1992 Nov;83(11):1128-31.
- Kusov YY, Gosert R, Gauss-Muller V. Replication and in vivo repair of the hepatitis A virus genome lacking the poly(A) tail. *J Gen Virol*. 2005 May;86(Pt 5):1363-8.
- Kvietkauskaitė R, Acaite J. Evaluation of an ELISA for detection of Antibodies to Sendai Virus in Swine Sera. *Turk J Vet Anim Sci*. 2004;28:373-6.

- Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem*. 1991 Mar;37(3):411-4.
- Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, *et al*. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci*. 2002 May;81(5):632-41.
- Leentvaar-Kuijpers A, Coutinho RA, Brulein V, *et al*. Simultaneous passive and active immunization against hepatitis A. *Vaccine*. 1992;10 Suppl 1:S138-41.
- Lei JH, Liu WQ, Sun CS, *et al*. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with *Schistosoma japonicum* by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. *Acta Trop*. 2009 Jul;111(1):39-43.
- Lemon SM, Jansen RW, Newbold JE. Infectious hepatitis A virus particles produced in cell culture consist of three distinct types with different buoyant densities in CsCl. *J Virol*. 1985 Apr;54(1):78-85.
- Lemon SM. The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products. *Vox Sang*. 1994;67 Suppl 4:19-23; discussion 4-6.
- Leslie GA, Clem LW. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med*. 1969 Dec 1;130(6):1337-52.
- Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Hepatitis A: a preventable threat. *Adv Ther*. 2005 Nov-Dec;22(6):578-86.
- Levesque S, Martinez G, Fairbrother JMPS. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. 2007 Apr;86(4):630-5.
- Locarnini SA, Coulepis AG, Kaldor J, *et al*. Coproantibodies in hepatitis A: detection by enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy. *J Clin Microbiol*. 1980 Jun;11(6):710-6.
- Loeken MR, Roth TF. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology*. 1983 May;49(1):21-8.
- Lu L, Ching KZ, de Paula VS, *et al*. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol*. 2004 Oct;85(Pt 10):2943-52.
- MacCallum FO, Bradley WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet*. 1944;244(6342):228.

- MacCallum FO. Homologous serum jaundice. *Lancet*. 1947;2:691-2.
- Manicassamy B, Medina RA, Hai R, *et al*. Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathog*. 2009;6(1):e1000745.
- Margolis HS, Nainan OV, Krawczynski K, *et al*. Appearance of immune complexes during experimental hepatitis A infection in chimpanzees. *J Med Virol*. 1988 Nov;26(3):315-26.
- Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S164-72.
- McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, *et al*. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J Clin Microbiol*. 1982 Nov;16(5):957-8.
- Mcdonald S. Acute yellow atrophy. *Edinburgh Medical Journal*. 1908;15(208).
- Melnick JL. Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1. *Intervirology*. 1982;18(3):105-6.
- Melnick JL. History and epidemiology of hepatitis A virus. *J Infect Dis*. 1995 Mar;171 Suppl 1:S2-8.
- Midthun K, Ellerbeck E, Gershman K, *et al*. Safety and immunogenicity of a live attenuated hepatitis A virus vaccine in seronegative volunteers. *J Infect Dis*. 1991 Apr;163(4):735-9.
- Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food*. 2002 Fall;5(3):159-69.
- Mohammed SM, Morrison S, Wims L, *et al*. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*. 1998 Oct;4(2):115-25.
- Moingeon P, Haensler J, Lindberg A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine*. 2001 Aug 14;19(31):4363-72.
- Morais LM, de Paula VS, Arantes MR, *et al*. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Jun;101(4):401-5.
- Morales MM. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? *Cienc Cult*. 2008;60(2):33-6.

- Motoi Y, Inoue S, Hatta H, *et al.* Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis.* 2005 Apr;58(2):115-8.
- Murray R. Viral hepatitis. *Bull N Y Acad Med.* 1955 May;31(5):341-58.
- Nainan OV, Xia G, Vaughan G, *et al.* Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):63-79.
- Nguyen CT, Tran TT. Hepatitis vaccination and prophylaxis. *Clin Liver Dis.* 2009 May;13(2):317-29.
- Nielsen R. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. *Vet Microbiol.* 1995 Mar;43(4):277-81.
- Niu MT, Salive M, Krueger C, *et al.* Two-year review of hepatitis A vaccine safety: data from the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). *Clin Infect Dis.* 1998 Jun;26(6):1475-6.
- Nuesch JP, Weitz M, Siegl G. Proteins specifically binding to the 3' untranslated region of hepatitis A virus RNA in persistently infected cells. *Arch Virol.* 1993;128(1-2):65-79.
- O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet.* 1993 Jul 31;342(8866):273-5.
- Palmenberg AC. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:603-23.
- Patterson R, Youngner JS, Weigle WO, *et al.* Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol.* 1962 Aug;89:272-8.
- Paul AV, Tada H, von der Helm K, *et al.* The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB). *Virus Res.* 1987 Aug;8(2):153-71.
- Paul JR, Havens WP, Sabin AB, *et al.* Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis. *JAMA.* 1945;128:911-5.
- Pauly D, Dorner M, Zhang X, *et al.* 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 Feb;88(2):281-90.

- Polson A, Coetzer T, Kruger J, *et al.* Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest.* 1985 Aug;14(4):323-7.
- Polson A, Coetzer T, Kruger J, *et al.* Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. 1985 Aug;14(4):323-7.
- Provost PJ, Bishop RP, Gerety RJ, *et al.* New findings in live, attenuated hepatitis A vaccine development. *J Med Virol.* 1986;20:165-75.
- Provost PJ, Emini EA, Lewis JA, *et al.* Progress toward the development of hepatitis A vírus particles. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R. Liss 1988:83-6.
- Purcell RH. Approaches to immunization against hepatitis A in vírus. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins 1991:41-6.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol.* 1992 Jun;73 (Pt 6):1365-77.
- Russel WMS, Burch RL. The principles of Humane Experimental Technique. London, UK: Methuen 1959.
- Saha SK, Saha S, Shakur S, *et al.* Community-based cross-sectional seroprevalence study of hepatitis A in Bangladesh. *World J Gastroenterol.* 2009 Oct 21;15(39):4932-7.
- Sanchez G, Populaire S, Butot S, *et al.* Detection and differentiation of human hepatitis A strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests. *J Virol Methods.* 2006 Mar;132(1-2):160-5.
- Schade R, Burger W, Schoneberg T, *et al.* [Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies]. *Altex.* 1994;11(2):75-84.
- Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, *et al.* 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 Apr;33(2):129-54.
- Schiff ER. Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine.* 1992;10 Suppl 1:S18-20.

- Shimizu M, Nagashima H, Sano K, *et al.* Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992 Feb;56(2):270-4.
- Shin JH, Yang M, Nam SW, *et al.* Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Sep;9(5):1061-6.
- Shin SJ, Lee SS, Manning EJ, *et al.* Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Microbiol.* 2009 Oct;47(5):600-9.
- Shouval D, Ashur Y, Adler R, *et al.* Single and booster dose responses to an inactivated hepatitis A virus vaccine: comparison with immune serum globulin prophylaxis. *Vaccine.* 1993;11 Suppl 1:S9-14.
- Silva Pde C, Vitral CL, Barcellos C, *et al.* [Hepatitis A in the city of Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological pattern and socio-environmental variables. Cross-analysis of SINAN and population census data]. *Cad Saude Publica.* 2007 Jul;23(7):1553-64.
- Sjogren MH, Tanno H, Fay O, *et al.* Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med.* 1987 Feb;106(2):221-6.
- Skinhoj P, Mikkelsen F, Hollinger FB. Hepatitis A in Greenland: importance of specific antibody testing in epidemiologic surveillance. *Am J Epidemiol.* 1977 Feb;105(2):140-7.
- Skinhoj P, Mathiesen LR, Kiryger P, *et al.* Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand J Gastroenterol.* 1981;16:1057-9.
- Stapleton JT, Jansen R, Lemon SM. Neutralizing antibody to hepatitis A virus in immune serum globulin and in the sera of human recipients of immune serum globulin. *Gastroenterology.* 1985 Sep;89(3):637-42.
- Stapleton JT. Hepatitis A virus: Biology, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical description, and Diagnosis. In: Specter S, ed. *Viral hepatitis: diagnosis, therapy and prevention*. New Jersey, U.S.A: Humana press 1999.
- Stokes Jr. J, Neefe J. The prevention and attenuation of infectious hepatitis by gamma globulin. *JAMA.* 1945;127:144-5.
- Sunwoo HH, Wang WW, Sim JS. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunol Lett.* 2006 Aug 15;106(2):191-3.

- Szmuness W, Dienstag JL, Purcell RH, *et al.* Hepatitis type A and hemodialysis: a seroepidemiologic study in 15 U.S. centers. *Ann Intern Med.* 1977 Jul;87(1):8-12.
- Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine.* 2000 Feb 18;18 Suppl 1:S57-60.
- Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR, *et al.* Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis.* 1986 Aug;154(2):231-7.
- Taylor AI, Gould HJ, Sutton BJ, *et al.* Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. *J Biol Chem.* 2008 Jun 13;283(24):16384-90.
- Tini M, Jewell UR, Camenisch G, *et al.* Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002 Mar;131(3):569-74.
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, *et al.* Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* 1984 Apr;72(4):955-62.
- Tokunaga T, Yamamoto S, Namba K. A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn J Cancer Res.* 1988 Jun;79(6):682-6.
- Veerasami M, Singanallur NB, Thirumeni N, *et al.* Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. *New Microbiol.* 2008 Oct;31(4):549-54.
- Villar LM, Esteves da Costa Mdo C, de Paula VS, *et al.* Hepatitis a outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Apr;97(3):301-5.
- Villar LM, Lampe E, Meyer A, *et al.* Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Dec;37(12):1779-87.
- Vincent IE, Lucifora J, Durantel D, *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):131-5.

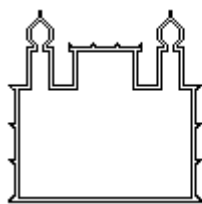
- Vitral CL, Gaspar AM, Yoshida CF. Two competitive enzyme immunoassays for the detection of IgG class antibodies to hepatitis A antigen. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991 Apr-Jun;24(2):79-85.
- Vitral CL, Yoshida CF, Lemos ER, *et al*. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998 Jan-Feb;93(1):1-5.
- Vitral CL, Gaspar AM, Souto FJ. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Mar;101(2):119-27.
- Vleugels B, Ververken C, Goddeeris BM. Stimulatory effect of CpG sequences on humoral response in chickens. *Poult Sci*. 2002 Sep;81(9):1317-21.
- Voegt H. Zur atilogie der hepatitis epidermica. *Much Méd Wschr*. 1942;89:76-9.
- Wang XZ, Fan B, Liu LG, *et al*. In vitro inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). *Mycopathologia*. 2008 Jun;165(6):381-7.
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*. 1995 Aug;16(8):392-8.
- Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, *et al*. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol*. 1986 Oct;60(1):124-30.
- Willner IR, Uhl MD, Howard SC, *et al*. Serious hepatitis A: an analysis of patients hospitalized during an urban epidemic in the United States. *Ann Intern Med*. 1998 Jan 15;128(2):111-4.
- Wofle TL, Rozmiarek CM. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academic Press 1996.
- Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K, *et al*. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1993 May;40(1):35-8.
- Yousef GE, Brown IN, Mowbray JF. Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. *Intervirology*. 1987;28(3):163-70.

Zuckerman AJ. The clinical and laboratory features of acute hepatitis in the Royal Air Force. Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv. 1965 Nov;24:340-6.

Zuckerman AJ. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: Deinhardt F, Deinhardt J, eds. *Viral Hepatitis: Laboratory and Clinical Science*. New York: Marcel Dekker 1983:3-32.

Zwioerek K, Bourquin C, Battiany J, *et al*. Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. Pharm Res. 2008 Mar;25(3):551-62.

ANEXO I



FIOCRUZ

CRUZ

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO

Laboratório de Desenvolvimento
Tecnológico em Virologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____, fui responsável pelo menor _____ convidado a participar de um estudo que irá avaliar anticorpos específicos contra o vírus que causa a hepatite A em amostras de soro e saliva em pacientes da comunidade de Purys, Três Rios.

Objetivo da pesquisa: O objetivo deste trabalho será investigar a possibilidade de utilizar as amostras de saliva pareada a amostra de soro para detecção de infecção recente ou passada pelo vírus da hepatite.

Exames e procedimentos. Será realizada a coleta de sangue venoso, 8mL. Também será coletada uma amostra de saliva com auxílio de um coletor apropriado. As coletas serão realizadas por técnicos especializados de laboratórios em seguida será feita a pesquisa de detecção dos anticorpos anti-HAV IgM e anti-HAV IgG.

Riscos: Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou rouidão no local. A coleta de saliva não leva nenhum risco ou desconforto.

Benefícios: Pelos testes que serão realizados, o Sr(a) poderá obter o benefício pessoal de ser informado se está protegido ou não contra o vírus da hepatite A e receber orientações sobre a necessidade de vacinação. Além de estar contribuindo para o progresso da pesquisa científica sobre a hepatite A. Autorizo, portanto, os profissionais do Instituto Oswaldo Cruz a utilizar uma amostra do meu sangue e de saliva para a realização dos exames para hepatite A e para fins de pesquisa científica, assim como a padronização de testes. Os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para publicação científica, de maneira confidencial e notificação destes às Instituições de Saúde Pública a nível de Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estadual e Municipal.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento sobre o estudo, você pode entrar em contato com as pesquisadoras: Renata Tourinho Santos, Vanessa de Paula, Luciane A. Amado. **Pavilhão Helio Peggy Pereira, sala B219. Tel: 2562-1876.**

Assinatura _____

RG _____ Fone: _____

Endereço: _____

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO II

Dear Pinto,

The PDF for your submission, "Biotechnology applied to production of IgY Anti-HAV", is ready for viewing.

Please login to the Elsevier Editorial System as an Author to view and approve the PDF of your submission.

url: <http://ees.elsevier.com/virmet/>
Your username is: marcelop

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/virmet/automail_query.asp

Your submission must be approved in order to complete the submission process and send the manuscript to the Journal of Virological Methods editorial office. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors.

Thank you for your time and patience.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Virological Methods

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

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](#)